

中華醫事科技大學生物科技研究所



碩士論文

蝴蝶蘭病原細菌之 PCR 檢測技術開發

Development of PCR detection

of phytopathogenic bacteria in *Phalaenopsis* orchids

研 究 生：蘇佩誼 (Pai-Yi Su)

指導教授：朱木貴博士 (Mu-Kuei Chu)

中華民國九十八年六月

## 壹. 前人研究

### 一. 蘭花簡介

蘭科植物 (Orchidaceae) 為重要的觀賞花卉，蘭科植物分布區域廣泛，除了極地與沙漠之外都有其蹤跡，目前蘭科植物至少包含有 850 個屬 (Genus)，其物種 (Species) 有 25,000 種以上 (張，2005)。台灣由於氣候溫暖潮濕及自然景觀環境的多樣性，適合各種蘭科植物棲息，從平地到海拔三千公尺以上之高山皆可發現其蹤跡，因此台灣擁有數百種以上的特有種，此外加上台灣優良的雜交育種技術，因而孕育出更樣貌繁多的各種蘭花 (鄭等，2008)。台灣島上地形的多樣化及佔全島 55% 的山地，有紀錄的蘭花種類約有 360 種，係全世界天然蘭花分布密度最高的地區，蘊育著豐富的蘭花資源，其中尤以蝴蝶蘭最為知名，堪稱是台灣的代表性蘭種 (張等，1999)。

蝴蝶蘭是最受歡迎的花卉作物，國人對其亦相當偏愛，因此有「蘭花之后」之雅號，其屬名 *Phalaenopsis* 是由 *phalaen* (原意為蝶蛾) 及 *opsis* (意為形象) 而來，普通名為蝴蝶蘭 (Moth orchid) (吳和李，2007)，在植物界的分類地位是被子植物門、單子葉植物綱、雌雄合蕊植物目、蘭科、樹蘭亞科、萬代蘭族、萬代蘭亞族、蝴蝶蘭屬 (Arditti, 1992)。

### 二. 蘭花產業的發展狀況

一九八〇年代，蘭花產業開始受到農業界、產、官、學、研等各方面的重視，而近二十年蘭花產開始蓬勃發展，特別是蝴蝶蘭已成為聞名於世之輸出品，目前市場上較常見之蘭花包括蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis*)、文心蘭 (*Oncidiums*)、石斛蘭 (*Dendrobium*)、嘉德利亞蘭 (*Cattleya*)、東亞蘭 (*Cymbidium*) 及仙履蘭 (*Paphiopedilum*)

等，蘭花銷售除內銷之外，外銷市場上已展現高度潛力，外銷產品包括 瓶苗、蘭苗、盆花及切花，主要銷售到美國、日本、荷蘭、香港、韓國、丹麥、加拿大等國家 (陳，2002)。而在外銷花卉中台灣已成為全世界蝴蝶蘭輸出量最高之國家，農委會更將其遴選為外銷旗艦之作物 (鄭等，2008)。蝴蝶蘭是大眾所喜愛的花卉作物，由於花具有亮麗的外觀及多變的樣式，並且有較長的開花期，因此市場規模日益蓬勃，依台灣行政院農委會農糧署資料指出，國內花卉種植面積約 1 萬 3 千 109 公頃，年產值約 118.3 億新台幣，其中蘭花種植面積約 600 公頃，年產值約 26 億新台幣。根據財政部關稅總局出口貨物統計資料顯示，2007 年蝴蝶蘭外銷產量為 5,536 公噸，外銷的產值為 16 億 4449.8 萬新台幣。

目前政府對蘭花產業的重點在於科技化的生產、育種、研發，以及防疫，在行政院農委會中程施政計劃中提及花卉生物科技園區的設立，欲結合產業基礎及生物科技人才，設立具蘭花生產、育種、貿易、展覽、研發、推廣等多功能的蘭花產業園區，並規劃整合已有的花卉產區，結合週邊觀光休閒資源。行政院於所公佈的『挑戰 2008 國家發展重點計劃』中，亦有花卉生物科技園區的設置計劃，由行政院農業委員會農糧處主辦，將利用蘭花產業的優越條件，透過舉辦國際性蘭花博覽會的方式，逐步推動蘭花產業生物科技園區的發展，提昇花卉產銷及研發機能，以增加台灣花卉在國際花卉市場的競爭力 (李和林，2007)。

### 三. 蘭花細菌性病害之種類

台灣屬於亞熱帶季風型氣候，夏季氣候高溫且潮濕，物種豐富多樣且可終年繁衍不斷，過去一再被公認是作物栽培的寶島，但對於影響植物生長的病蟲害而言，高溫多濕的環境正適合各種病蟲害的

滋長，因而造成植物病害的多樣性及高發生率（鄭等，2006）。植物產生病害的病原微生物中，例如病毒、類病毒、植物菌質體以及細菌，一旦入侵寄主會形成系統性感染，病原會分布至植物各部位的組織中，甚至會經由無性繁殖過程，傳播到後代種苗，造成全面性的感染，帶有病原體的種苗經過栽培後，有的會在生育初期就顯現明顯病徵，不僅造成寄主植物生長緩慢、品質低落，更嚴重的是會形成病害傳播的根源，而危害整體作物的生產（張，2005）。

目前引起台灣蝴蝶蘭細菌性病害的主要病原細菌有三種，分別為褐斑病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*，簡稱 AAC)、葉斑病菌 (*Burkholderia gladioli*，簡稱 BG)及軟腐病菌 (*Pectobacterium chrysanthemi*，簡稱 PCH)，當蝴蝶蘭一旦受到病菌之感染，常將整棵植株丟棄造成不小的經濟損失，影響蘭花的產量與產值。

#### (一).蘭花細菌性褐斑病 (Bacterial brown spot of orchid)

由 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* 所引起之蘭花病害最早發現於義大利及美國加州，近一、二十年來我國蝴蝶蘭經濟栽培規模大幅擴增，蘭花於溫室栽培常處於溫暖、潮濕的環境正適於本病發生，此病害大多發生在熱帶及亞熱帶國家，如：美國、義大利、菲律賓、中國大陸及臺灣，而在臺灣主要發生在7月至10月的雨季，高溫多濕的夏季和颱風過後發生最為嚴重（黃，2006）。

##### 1. 病原菌

*Pseudomonas cattleyae* 屬於原核生物 (Procaryote)，假單胞菌科 (Pseudomonaceae)，*Acidovorax* 屬 (Genus)，*avenae* 種 (Species)，1992年 Willems 氏等建議將本菌更名為 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*，此菌為革蘭氏陰性，好氣細菌，菌體為棍棒狀，大小為  $0.5-1.0 \times 2.0$  mm，具 1-2 單極生鞭毛，不產生螢光色素，在 King's B

或 *Pseudomonas* Agar F 培養基上形成乳白色略凸起的菌落 (黃, 2005)。本病菌於 20~32°C 間均生長良好, 最適溫度約 28°C, 最高約 40°C, 最低約 12°C, 在溫暖、高濕環境下最容易發病 (黃, 1994)。病原細菌可以藉由葉面澆水、噴霧或施肥而散播至健康植株上, 造成二次感染, 濕度高時或以手觸摸水浸狀病斑處, 會溢出許多乳白色菌泥, 內含極多具有感染力之細菌 (黃, 2006)。

## 2. 病徵

褐斑病菌可感染各齡期的蝴蝶蘭葉片, 病徵會因寄主品系、發病條件不同而有差異, 葉片受感染後首先會出現數毫米淡褐色水浸狀斑點, 隨後擴大成為褐、暗褐或黑色的不規則凹陷壞疽斑, 周圍具明顯黃暈, 病斑可相互融合成為大斑塊; 有些感染則會繼續擴展, 成為橢圓、長條形或不規則形的深綠色或黑褐色大型水浸狀斑, 病斑周圍會出現墨綠色環紋, 以手觸摸病斑處仍覺堅硬 (曹, 2004)。濕度高時如傷口破裂會溢出乳白色的菌泥, 最後葉片黃化乾枯, 病勢如擴展到生長點則導致整株死亡, 幼苗如遭受感染後, 則迅速軟腐而壞死 (黃, 2005)。

## 3. 寄主範圍

本病菌除可感染蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis*) 外, 也可感染嘉德麗亞蘭 (*Cattleya*)、鳳仙花 (*Cypripedium*)、香草蘭 (*Vanilla*)、石斛蘭 (*Dendrobium*)、文心蘭 (*Oncidiums*)、千代蘭 (*Ascocenda*)、朵麗蝶蘭 (*Doritaenopsis*)、拖鞋蘭 (*Paphiopedilum*) 及狐狸尾蘭 (*Phynchosstylis gigantea*) (黃, 2005)。

## 4. 診斷技術

可以利用壞疽斑及水浸狀斑二種病徵, 壞疽斑會有黃暈或水浸狀

斑的堅硬觸感與泌出菌泥，是肉眼初步鑑別的依據，進一步則可以切取病斑與健部交界處小塊組織，置於載玻片上的水滴中，覆上蓋玻片，直接在光學顯微鏡下檢視，如有發現成群或成團微小的游動菌體自組織中湧出，可確認其為細菌性病害。欲分離該細菌可使用 75% 酒精擦拭病斑與健康組織交界表面後，將病斑與健康組織之交界處剪下，並於無菌水中磨碎，將磨出液培養於含 0.25% 葡萄糖的營養培養基 (Nutrient agar)、King's B 或 *Pseudomonas* Agar F 上，如為褐斑病則 2-3 天後通常會出現純度頗高的病菌菌落，病菌可製備成每毫升約含  $10^7$ - $10^8$  細胞的懸浮液，用於注射菸草葉片後於 24 小時內可見被注射組織崩解的過敏性反應 (陳，1993；許，1998；鄭等，2008)。

## (二). 蘭花細菌性葉斑病 (Bacterial leaf spot of orchid)

*Burkholderia gladioli* (Severini, 1913) 原名為 *Pseudomonas gladioli* 或 *Pseudomonas marginata* (Whitby et al., 2000)，最早是在 1921 年由 McCulloch 發現感染在唐菖蒲上的病原菌 (McCulloch, 1921)，有研究指出 *Burkholderia gladioli* 可分為三個病原型 (pathovars)，分別為 *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*、*Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* 及 *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* (Maeda et al., 2006)。

### 1. 病原菌

*Burkholderia gladioli* 屬於革蘭氏陰性好氧桿菌，具極生鞭毛、游動性及趨化性，在 KB 培養基上不具螢光性，但可產生具擴散性之黃色素，菌落為乳白色，本病菌可藉由雨水及噴灌水蔓延至鄰近健全之植株，由傷口或自然開口侵入感染，高溫多濕的環境下有利於病勢之發展 (蘇，1997)。

## 2. 病徵

最初在葉片形成暗綠色水浸狀小斑點，會逐漸擴大轉化成褐色斑，病斑週圍偶有黃暈存在，嚴重者會造成整個葉片或整株褐變黃化進而導致組織腐爛死亡 (Roy and Heinemann , 2006)。

## 3. 寄主範圍

本病菌亦會感染洋蔥 (Onion) (Lee et al., 2005)、蘑菇 (Mushrooms) (Lincoln et al., 1991)、稻米種苗 (Rice seedlings) (Kato et al., 1992)、鳳梨 (*Ananas comosus* (L.) Merr.) (許等, 2008)、櫻桃 (*Malpighia glabra*) (Li and Sholberg, 1992)、天堂鳥 (*Sterlitzia reginae*) (Cirvilleri et al., 2006)、唐菖蒲 (*Gladiolus gandavensis*) (Hseu, 1994)、蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis*) (Sung et al., 2006)、嘉德利亞蘭 (*Cattleya*)、石斛蘭 (*Dendrobium*)、文心蘭 (*Oncidium*)、堇花蘭屬 (*Miltonia*) (宋等, 2006)。

## 4. 診斷技術

鑑定時可利用生理生化測定、選擇性培養基、Biolog 系統鑑定、脂肪酸組成分析、專一性引子聚合酶連鎖反應分析及 16S rDNA 和 23S rDNA 序列比對結果來鑑定 (Hu et al., 2001; Salles et al., 2002 ; Bauernfeind et al., 1998 ; 許等, 2008)。

### (三). 蘭花細菌性軟腐病 (Bacterial soft rot of orchid)

台灣地處亞熱帶地區，夏季氣候高溫潮濕，細菌性軟腐病於田間經常發生為台灣重要之細菌性病害，在溫暖潮溼之多雨季節常可造成田間蔬菜與花卉作物之嚴重損失 (Lee et al., 2006)。其主要病原細菌為 *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* (PCC) 與 *Pectobacterium*

*chrysanthemi* (PCH)，而造成蘭花細菌性軟腐病主要是由 *Pectobacterium chrysanthemi* 所引起的(Dicky and kelman, 1988)。蘭花細菌性軟腐病所造成的病害地理分佈很廣，在歐洲、美國、亞洲、澳洲等許多國家及臺灣各地蘭園，均有本菌引起之各種作物軟腐、萎凋或矮化的記錄(何等，2005)。

## 1. 病原菌

*Pectobacterium chrysanthemi* 屬於原核菌 (Procaryote)，腸內生菌科 (Enterobacteriaceae)，*Pectobacterium* 屬，為革蘭氏陰性細菌 (Gram-negative)，兼性厭氣 (Facultatively anaerobic)，菌體為棍棒狀 (Rod-shaped)，大小為  $0.5-1.0 \times 1.0-3.0 \mu\text{m}$ ，具周生鞭毛(Peritrichous)，在一般細菌培養基上形成乳白色、具皺摺光澤的扁平菌落，會發酵葡萄糖(Glucose)，具有 Catalase 和  $\beta$ -galactosidase 的活性，不具有 Oxidase 和 Urease 的活性，能還原硝酸(Nitrate)成亞硝酸(Nitrite)，可產  $\text{H}_2\text{S}$ (馮，2005)。*P. chrysanthemi* 部分菌株可以在 YDC 培養基上產生非水溶性藍色色素 (Indigoidine，簡稱 idg 或 ind)，使菌落成為藍色 (Starr et al., 1966)。

## 2. 病徵

病原菌藉由寄生植物之有性或無性繁殖體、灌溉水的飛濺、空氣中懸浮微粒、昆蟲、土壤或者農機具操作過程中，由植物傷口或氣孔等自然孔口侵入植物體之幼嫩組織或儲藏器官(曾，1993；曾等，1994)。當軟腐細菌從植物傷口侵入後，會在細胞間隙液體中繁殖，並分泌果膠分解酵素 (Pectolytic enzymes)，分解細胞中層和細胞壁，造成感病部位葉肉組織分解成水液，葉片失去支撐力而下垂，病區表皮與葉肉組織分離成水泡狀，容易破裂，釋出第二次感染原，就會有數十或數百棵之蝴蝶蘭植株死亡(曾和徐，2003)。



### 3. 寄主範圍

本病原菌可以感染在甘藷 (*Ipomoea batatas*) (Clark et al., 1989)、馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) (曾等, 1981)、青蔥 (*Allium fistulosum*) (鍾, 1992)、胡蘿蔔 (*Daucus carota*) (Tzeng and Hsu, 1981)、白蘿蔔 (*Raphanus sativa*) (Chuang et al., 1989)、玉米 (*Zea mays*) (Tzeng and Hsu, 1981)、唐菖蒲 (*Gladiolus gandavensis*) (蘇等, 1996)、向日葵 (*Helianthus annuus*) (許等, 2004)、海芋 (*Zantedeschia*) (李, 1994; Lee et al., 2002)、蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis*) (Lee and Yu, 2006; 馮, 2005)、文心蘭 (*Oncidium*) (黃, 2005)、狐狸尾蘭 (*Phynchosstylis gigantea*) (王, 1984)等。

### 4. 診斷技術

在軟腐病菌病害診斷及病原偵測上,目前傳統的檢測技術可以依外觀形態、生理生化特性、寄主範圍(Dickey, 1979)、modified crystal violet pectate(CVP)選擇性培養基 (Arias et al., 1998; van der Wolf and Pérombelon, 2002)、增量培養方法配合選擇性培養基(Meneley and Stanghellini, 1976)、血清技術(Maher et al., 1986)的方式診斷,在分子生物技術的方面可以利用核酸探針(DNA probe) (Cook and Sequeira, 1991)、增殖性片段多型性分析(amplified fragment length polymorphism, AFLP) (Avrova et al., 2002)、限制性片段長度多態性(restriction fragment length polymorphism,RFLP) (Boccaro et al., 1991)、隨機複製多型性核酸技術 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) (許等, 2007)與聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) (Darrasse et al., 1994; Ward and De Boer, 1995)等方法加以區分。使用培養基培養的方式,所需要的時間較長,也較難偵測到低量之病菌,而血清學方法雖然簡便專一性也較高,但是靈敏度不

夠理想 (朱, 1995)。而近年來分子生物技術發展快速，聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術的研發 (Saiki et al., 1988)，使得檢測的過程變得省時省力且更快速靈敏 (Henson, 1993)。現今 PCR 技術已成功應用在許多植物病原細菌的偵測，如 *Clavibacter* 屬 (Pan et al., 1998)，*Erwinia* 屬 (Hyman et al., 1997)，*Pseudomonas* 屬 (Schaad et al., 1989) 和 *Xanthomonas* 屬 (Pan et al., 1999; Toth et al., 1998; Verdier et al., 1998) 等多種植物病原細菌 (蔡, 2000)。

#### 四. 蘭花細菌性病害之DNA檢測法

##### (一).16S rDNA

核糖體核酸是構成生命重要的基本遺傳物質，在所有生物中 rDNA (ribosomal deoxyribonucleic acid) 都具有相當類似的功能，在最原始的生命出現演化之前，核糖核酸基因普遍的存在於生物的體內，以銜接重覆單位存在於染色體上，這些重覆單位的演化是一致的，序列完全相同，且因重覆數多，經由 PCR 反應後可得到較強的訊號 (Hillis and Dixon, 1991)。核糖體核酸存在於在原核細胞 (Prokaryotes) 與真核細胞 (Eukaryotes) 的細胞質當中，按照沉降係數 (Sedimentation coefficient) 的不同可以分成 70S 與 80S 兩種；而 70S 存在於原核細胞中，由 30S 與 50S 兩種次單位 (Subunit) 所組成，共 3 個 rRNA (ribosomal ribonucleic acid)，30S 中帶有一個 16S rRNA 分子，而 50S 中則具有 23S 與 5S 等兩種 rRNA，協助將 mRNA 轉譯 (translation) 成蛋白質。由於核糖體在蛋白質表現系統中扮演著相當重要的功能，其核酸序列在演化的過程中具有相當高的保留性，所以許多學者希望藉由此特性來做為生物之間的鑑別，目前以 16S rRNA 基因序列最常被應用於細菌的演化及分類學上的研究，原因是因為：(1) 細菌具有

16S rRNA 基因，並且經常有多個基因散落在細菌的基因體內不同的位置上。(2) 16S rRNA 基因其功能及序列不易隨著時間改變，因此可用來作為不同細菌之間演化的依據。(3) 16S rRNA 基因的長度約 1,500 bp，具有足夠的序列資訊可以作為不同菌種細菌之判別依據。但是還是有部份的細菌無法用 16S rRNA 基因定序的方法來加以鑑定，原因是因為：(1).基因庫裏沒有的新菌種則無法鑑定。(2).此一菌種在基因庫裏的 16S rRNA 基因序列過少或不完整。(3).不同菌種間具有相似或完全相同的 16S rRNA 基因序列。(4).在基因庫中，不同種的 16S rRNA 基因序列卻有相同的菌種命名。所以在利用 16S rRNA 基因來鑑定細菌時，最好能夠使用其它的 housekeeping gene 來協助鑑定的準確性 (彭，2008)。

## (二).內部轉錄區間

內部轉錄區間 (Internal transcribed spacer, ITS)，存在於原核細胞中，位置介於細菌染色體之 16S rRNA 與 23S rRNA 核酸序列間，不具轉錄產物之功能，具有高度的保留性，演化速率較快，被廣泛的使用於同屬內物種間的研究和類群之親緣關係分類的依據 (陳，2003)。目前許多研究利用細菌 ITS 序列來對細菌進行辨識，如 Kabadjova 等人 (2002) 利用 ITS 以及 RFLP 技術，發現可依 ITS 不同的大小以及其包含之 tRNA 之不同來對 *Carnobacterium* 屬之細菌做辨識，而 Xiong 等人 (2006) 將經過設計之 ITS 基因序列應用於生物芯片中，針對 *Mycobacterium* 屬之細菌做鑑定，研究結果可利用 ITS 基因序列精確的辨認出菌種，相較於一般生物生化特性之檢驗方式較便利。Ciardo 等人 (2006) 利用酵母菌 ITS 序列，針對 113 株在臨床常見菌株做檢測，分析結果具有 98% 的準確度可以鑑定出正確的菌種，但是若是以生物生化特性的方式，只有 87% 可以鑑定出菌種

或菌屬的層級，有 7% 的菌株無法辨識，6% 的菌株則是鑑定錯誤，可見 ITS 能夠比以生化鑑定的方式更為精確，且也較為便宜。徐和林 (2002) 以聚合酵素連鎖反應的技術，利用 16S-23S rDNA spacer 核酸序列來分析國外植物菌質體之親緣關係，並進行分類。Sudagidan 等人 (2005) 利用 16S-ITS 區間序列在配合 RFLP 之技術來作為葡萄球菌鑑定與分類之依據。

### (三).gyrase DNA

在一般狀態下，細胞內 DNA 分子是呈一種緊密的負超螺旋結構 (Negative supercoil)，DNA 分子在進行複製、轉錄、修補時都需將雙股 DNA 分子分開來，此時 DNA 分子間的負超螺旋結構之解開需要酵素作用，一般通稱為拓撲酵素 (Topoisomerase)。在細菌上的拓撲酵素可分兩大類 (type)：Type I 包含 DNA topoisomerase I 及 DNA topoisomerase III，而 Type II 則包含 topoisomerase II 及 topoisomerase IV。DNA gyrase 酵素在細菌上是 DNA topoisomerase II 的簡稱，正常有功能的 gyrase 蛋白是由 *gyrA* 及 *gyrB* 基因分別轉譯出的兩個 A subunits (GyrA) 及兩個 B subunits (GyrB) 所共同組成的四極體 (Tetramer) 蛋白 (A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) (Klevan and Wang, 1980)。在 gyrase 蛋白上 GyrA subunit 負責切斷及重新連結 DNA 分子，GyrB subunit 則具有 ATP 水解酵素活性 (Mizuuchi et al., 1978)。*gyrB* 基因不易受特殊生長環境影響而發生突變，序列演化的速度比 16S rRNA 快，很多分類研究利用 *gyrB* 基因序列來分析不同細菌族群間之類緣關係，例如：*Aeromonas* 屬、*Mycobacterium* 屬、*Pseudomonas* 屬等，其結果顯示 *gyrB* 基因序列可以成功的區別類緣關係相近菌種之種間與種內菌株間甚至不同族群間的差異，且區分能力明顯，可作為研究細菌演化和菌種分類鑑定之理想標誌 (Polygenetic marker) (王，2008)。

#### (四).rpoB 與 rpoD DNA

原核生物的轉錄催化酵素，為 RNA 聚合酶 (RNA polymerase) 是轉錄作用時主要執行者，RNA 聚合酶最早由 Weiss 及 Hurwitz 於 1960 年分別發現。Bautz 等人 (1969) 純化 RNA 聚合酶時發現，其由不同的次單元分別是  $\alpha$ ， $\beta$ ， $\beta'$  及  $\sigma$  所組成，而且其分子數的比例為 2:1:1:1，本研究中所使用之 *rpoD* 基因 (RNA polymerase sigma factor Sigma-70)，為細菌生長所必需的因子，主要負責菌體內一般性之轉錄作用 (Housekeeping transcription)，又稱為 sigma 因子 (Primary sigma factors)。而 *rpoB* 基因 (DNA-dependent RNA polymerase beta-subunit) 是一種複雜的催化酵素，屬於 RNA 作用之催化位點負責鏈的開始與延長 (Severinov et al., 1996)。在 *rpoB* 基因序列中有部份區域具有高度保留性在物種的區別上是值得被關注的 (Kim et al., 1999)，有文獻指出 *rpoB* 基因序列可以用來作為腸內細菌之分類與鑑定的依據 (Mollet et al., 1997)，也可作為一種生物標誌在研究生物多樣性之相關的研究上 (Giacomazzi et al., 2004)。

#### (五).idg DNA

藍色素最早發現於 *Pseudomonas indigofera*，目前已經有研究指出 *Arthrobacter atrocyaneus*、*A. polychromogenes*、*Corynebacterium insidiosum*，*Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosum* 及 *E. chrysanthemi* 等細菌皆可以產生藍色素 (朱，1995)。在 *Erwinia* 屬軟腐細菌中目前發現僅有 *E. chrysanthemi* 培養在 yeast-extract dextrose calcium-carbonate (YDC) 培養基上可產生藍色素 (Indigoidine)，使其菌落形成藍色是鑑定上之一重要特性 (Dickey and Kelman, 1988；朱，1995)。Kuhn 等人 (1965) 定出 *E. chrysanthemi* 與其他細菌所產生之藍色素結構為 5,5'-diamino- 4,4' -dihydroxy-

3,3'-diazadiphenoquinone-2,2'的 Indigoidine 化合物。研究指出有些 *E. chrysanthemi* 菌株在 YDC 上並不會產生藍色素，但以突變劑 nitrosoguanidine 處理後即可得到產生藍色素之突變菌株，這結果表示 *E. chrysanthemi* 菌株均可能有藍色素基因之存在只是沒有表現而已，並定出此菌株之藍色素基因位於染色體上 (朱，1995)。

## 五. Multiplex PCR

Multiplex PCR是一種較新的檢測技術，此方法可針對不同目標檢體，設計出不同目標基因片段長度之特異性引子，混合多組特異性引子於PCR反應中，以一次PCR之反應過程複製出目標樣品之基因片段，依據其片段長度之差異性作為檢測樣品種類之判別 (Periasamy et al., 2006)。目前Multiplex PCR已被廣泛的應用在偵測病原細菌和病毒，以及相近的菌種分群。Wang 等人 (2002) 設計出七條引子，其中包括兩條共通引子及五條特異性引子，組合成五對引子組，使用 Multiplex PCR同時分析五種不同腸毒素型的金黃色葡萄球菌。

## 貳. 材料方法

### 一、 供試菌株

本研究所使用之供試菌株(*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, 簡稱 AAC、*Burkholderia gladioli*, 簡稱 BG 及 *Pectobacterium chrysanthemi*, 簡稱 PCH)、由台南縣新化鎮台南區農業改良場鄭安秀博士所提供，菌株代號及分離地點詳見表一。

### 二、 菌株培養

固態培養時以接種環挑取懸浮液，以四區劃線法於 Nutrient Agar (NA)培養基上，以 28℃ 恆溫培養隔天，挑取單一菌落於 Nutrient Broth (NB)中進行液態培養，置於 28℃ 恆溫震盪培養隔天，供試菌株皆保存於 15% 甘油中，分別放置於 -20℃ 及 -86℃ 冰箱低溫保存。

### 三、 染色體DNA之純化

本研究使用 GeneMark®之染色體 DNA 抽取套組 (Genomic DNA Purification Kit)，純化之步驟如下：將供試菌株培養於 5 ml 的 NB 培養基中，於 28℃ 培養隔天，將菌液離心 (12,000 rpm，2 min)後將菌體懸浮於 700µl 之 Extraction solution 中。混合均勻後加入 20µl 之 proteinase K stock solution (20mg/ml) 並於 56℃ 水浴器中作用 3 小時，隨後再加入 700µl DNA Binding solution 置於 56℃ 水浴器中直到液體呈現澄清為止。將液體轉移至由 Spin column 及 Collection tube 所組合成的離心管中離心 (12,000 rpm，1 min) 去除下層液，再加入 700µl 之 Wash solution 離心 (12,000 rpm，1 min) 去除下層液，此動作重複兩次。之後離心(12,000 rpm，10 min)將 Wash solution 去除乾淨。將 Spin column 移至新的微量離心管，放置烘箱中，10 min。加入 30µl 無菌水於 Spin column，離心 (12,000rpm，3 min) 即可得到純化後之 DNA 樣品。

#### 四、病原細菌核酸序列資料之收集與分析

本研究比對分析所使用之 ITS 序列資料來自 National Center for Biotechnology Information (NCBI) ( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> )，針對不同之植物病原細菌，係以屬為單位來收集 ITS 資料，分別為 *Acidovorax* 屬、*Burkholderia* 屬及 *Pectobacterium* 屬。自每筆細菌 ITS 資料獲取主要 4 種資訊，分別為 Accession number、Genus、Species 及細菌 ITS 之 Sequence 資料，各屬細菌資料數為: *Acidovorax* 30 筆、*Pectobacterium* 50 筆、*Burkholderia* 20 筆，引子之設計依據多序列比對之結果，所使用之比對資料除上述資料，亦將本研究所定序之資料加入，希望引子之設計能符合實際檢測時之需求。

#### 五、聚合酵素鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)(參考文獻)

本研究所使用的機器為 LABNET-9600G，PCR 反應液中含 1 $\mu$ l dNTP (2.5 mM)，1 $\mu$ l forward primer(5  $\mu$ M)與 1 $\mu$ l reverse primer(5  $\mu$ M)，1 $\mu$ l template DNA，2 $\mu$ l 10X PCR reaction buffer，0.2  $\mu$ l Taq DNA polymerase (5U/ $\mu$ l)，並加入二次水 (ddH<sub>2</sub>O) 至總體積為 20 $\mu$ l。反應的熱循環溫度及時間如下:先以 95 $^{\circ}$ C 變性反應 5 分鐘，接下來 95 $^{\circ}$ C 變性反應 30 秒，黏合反應見表二，72 $^{\circ}$ C 延展反應 30 秒等三步驟進行 30 個循環(cycles)複製，最後 72 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘。PCR 反應產物之分析係使用 1.5% 洋菜膠電泳，並以 100 bp DNA marker (Violet) 為產物大小之標識。

#### 六、PCR產物之膠體電泳分析

本研究之膠體電泳分析，係將完成複製作用之 PCR 產物進行水平電泳分析，以確定是否有產物及產物之大小。分析時取 3 $\mu$ l 之 PCR 產物與 1 $\mu$ l 6X loading dye 混合均勻，經由 1.5% 膠體及 0.5X TAE buffer，並以 100 bp DNA marker 作為分子量大小的標記，以 100 伏



特電壓進行電泳分析進行 30 分鐘後，並以 Ethidium bromide 染色 5 分鐘後，利用 BIO-RAD 照相儀器影像分析處理系統 Quantity One 在 UV 燈下觀察並記錄電泳分析之結果。

#### 七、 PCR產物之純化

本研究使用 GeneMark®之 DNA clean/Extraction Kit 純化複製之 DNA 片段。純化步驟如下：將 PCR 複製之產物轉移至微量離心管中，並加入與 PCR 產物等量體積之 Binding solution 並使其混合均勻。將混和後之液體轉移至由 Spin column 及 Collection tube 組合之離心管中，離心(12,000rpm，2 min)，去除下層廢液。加入 700µl Wash solution 後離心(12,000rpm，1 min)，去除下層廢液，此步驟重複二次。之後進行離心(12,000rpm，5 min)後將 Wash solution 去除乾淨。將 Spin column 移至新的微量離心管，放置於烘箱，5 min。加入 30µl 無菌水於 Spin column，離心(12,000rpm，3 min)即可得到純化之 DNA 產物，使用 1.5% 洋菜膠電泳，並以 100 bp DNA marker 為大小標幟進行電泳分析。

#### 八、 PCR 產物之接合作用

利用 pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, USA)將所分離純化的 PCR 產物構築於 pGEM-T Easy 載體上。取 4ul 純化後之 PCR 產物，加入 5µl 的 2X 黏接緩衝溶液，0.5 µl 的 pGEM-T Easy vector，0.5 µl 的 T4 DNA ligase，使總體積為 10 µl，置於 20°C 反應 1 小時後放置於 4°C 冰箱作用至隔天，將反應液進行轉型作用。

#### 九、 大腸桿菌勝任細胞之轉型

將 10 µl 上述之接合反應液轉移至裝有勝任細胞之微量離心管內，並放置於冰上反應 30 分鐘，再將離心管放置於 42°C 乾浴器中 Heat shock 處理 90 秒，再迅速放置冰上 2 分鐘。然後加入 800 µl LB

培養液於 37°C，120 rpm 振盪培養 1 小時後，取 100 µl 菌液在含有 ampicillin、X-gal 及 IPTG 的 LB 平板培養基上塗抹均勻，置於 37°C 培養隔天，挑選白色菌落進行分析。

#### 十、 PCR產物之定序分析

純化之 PCR 產物送至台北源資生物科技股份有限公司定序，使用自動化核酸定序儀 (Applied Biosystems, ABI 3730)，利用 BigDye Terminators 螢光標記，所有反應均在同一個試管中進行，每個樣本可由電腦自動解讀平均 1 kb 的有效數據。

#### 十一、 生物資訊分析

本研究之單一序列比對係利用 National Center for Biotechnology Information 的 BLAST 軟體進行序列分析；而多序列比對則是利用 European Bioinformatics Institute 之 ClustalW (Multiple Sequence Alignment)進行多序列分析比對，引子之設計係利用多序列分析比對選出差異性較明顯之區域做為專一性引子設計的依據。本研究所使用之引子如表二所示。

#### 十二、 專一性測試

本研究從 AAC、BG 及 PCH 之菌株中各挑選出 3 株菌株，*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* 之代號分別為 AAC12、AAC13、AAC14；*Burkholderia gladioli* 之代號分別為 OP1、OP43、HD10；*Pectobacterium chrysanthemi* 之代號分別為 ECH3、ECH12 及 ECH15，使用其染色體 DNA 進行專一性引子 AAC ITS、AAC\_rpoB\_ID、BG ITS\_ID、BG\_gyrB\_ID、BG\_rpoD\_ID、PEC ITS、idgA 及 idgB 之 PCR 反應，測試結果可得知引子或是引子組是否具有足夠之專一性，並判斷可否用於後續之檢測技術開發上。

#### 十三、 靈敏度測試

(1)將 AAC、BG 及 PCH 之染色體 DNA，以分光光度計測其 O.D. 值後，加入無菌水以十倍連續梯度稀釋法的方式進行稀釋，使每一管的濃度為 10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg 及 10 fg/μl，將稀釋後之染色體 DNA 當作 template DNA 進行專一性引子 AAC ITS、AAC\_rpoB\_ID、BG ITS\_ID、BG\_gyrB\_ID、BG\_rpoD\_ID、PEC ITS、idgA 及 idgB 之 PCR 反應，測試結果可得知引子或是引子組是否具有足夠之靈敏度，並判斷可否用於後續之檢測技術開發上。

(2)將 AAC、BG 及 PCH 培養於 NB 液態培養基中培養 14-16 小時後以無菌水懸浮，並調整期 OD<sub>620</sub> 之讀值為 0.3 約為 10<sup>8</sup> CFU/ml，並以 10 倍系列稀釋，使每一管的菌數為 10<sup>8</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup> CFU/ml，將不同濃度之稀釋菌液各取 1μl 之菌體 DNA(即 PCR 反應所得測得之菌量依序為 10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>1</sup>、10<sup>0</sup> CFU/μl) 進行專一性引子 AAC ITS、AAC\_rpoB\_ID、BG ITS\_ID、BG\_gyrB\_ID、BG\_rpoD\_ID、PEC ITS、idgA 及 idgB 之 PCR 反應。測試結果可得知所測試之引子組是否具有足夠之靈敏度，並判斷可否用於後續之檢測技術開發上。

#### 十四、 Multiplex PCR

##### (一).AAC 之 Multiplex PCR

在同一管 PCR tube 中加入 AAC ITS 及 AAC\_rpoB\_ID 之引子組針對 AAC16、AAC17 及 AAC18 菌株之染色體 DNA，進行 Multiplex PCR 反應。所使用的機器為 LABNET-9600G，PCR 反應液中含 1μl dNTP (2.5 mM)，1μl AAC ITS F (5 μM)、1μl AAC ITS R (5 μM)及 1μl AAC\_rpoB\_IDF (5 μM)、1μl AAC\_rpoB\_IDR (5 μM)，1μl template DNA，2μl 10X PCR reaction buffer，0.2 μl Taq DNA polymerase (5U/μl)，並加入二次水 (ddH<sub>2</sub>O) 至總體積為 20μl。反應的熱循環溫

度及時間如下:先以 95°C 變性反應 5 分鐘，接下來 95°C 變性反應 30 秒，55°C 黏合反應 30 秒，72°C 延展反應 30 秒等三步驟進行 30 個循環 (cycles) 複製，最後 72°C 反應 10 分鐘。PCR 反應產物之分析係使用 1.5% 洋菜膠電泳，並以 100 bp DNA marker (Violet) 為產物大小之標識。

## (二).BG 之 Multiplex PCR

在同一管 PCR tube 中加入 BG\_ITS、BG\_gyrB\_ID 及 BG\_rpoD\_ID 引子組針對 OP5、HD15 及 PH5 菌株之染色體 DNA，進行 Multiplex PCR 反應。所使用的機器為 LABNET-9600G，PCR 反應液中含 1µl dNTP (2.5 mM)，0.5µl BG\_Uni\_ITS F (5 µM)、0.5µl BG\_ITS\_IDR (5 µM)、1µl BG\_gyrB\_IDF (5 µM)、1µl BG\_gyrB\_IDF (5 µM) 及 1µl BG\_rpoD\_IDF (5 µM)、1µl BG\_rpoD\_IDF (5 µM)，1µl template DNA 及，2µl 10X PCR reaction buffer，0.2 µl Taq DNA polymerase (5U/µl)，並加入二次水至總體積為 20µl。反應的熱循環溫度及時間如下:先以 95°C 變性反應 5 分鐘，接下來 95°C 變性反應 30 秒，50°C 黏合反應 40 秒，72°C 延展反應 30 秒等三步驟進行 30 個循環複製，最後 72°C 反應 10 分鐘。

## (三).PCH 之 Multiplex PCR

在同一管 PCR tube 中加入 PEC\_ITS、idgA 及 idgB 引子組針對 ECH1、ECH3 及 ECH12 菌株之染色體 DNA，進行 PCR 反應。所使用的機器為 LABNET-9600G，PCR 反應液中含 1µl dNTP (2.5 mM)，0.5µl PEC\_Uni\_ITS F (5 µM)、0.5µl PEC\_ITS\_R (5 µM)、2µl idgA start 5'F (5 µM)、2µl idgA stop 3'R (5 µM) 及 1µl idgB start 5'F (5 µM)、1µl idgB stop 3'R (5 µM)，1µl template DNA 及，2µl 10X PCR reaction buffer，0.2 µl Taq DNA polymerase (5U/µl)，並加入二次水至總體積為

20 $\mu$ l。反應的熱循環溫度及時間如下:先以 95 $^{\circ}$ C 變性反應 5 分鐘，接下來 95 $^{\circ}$ C 變性反應 30 秒，52 $^{\circ}$ C 黏合反應 40 秒，72 $^{\circ}$ C 延展反應 30 秒等三步驟進行 30 個循環複製，最後 72 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘。

#### (四).AAC、BG 及 PCH 之 Multiplex PCR

在同一管 PCR tube 中加入 AAC\_ITS、BG\_ITS、PCH\_ITS 及 idgA 引子組與混合後之 AAC、BG 及 PCH 菌株進行 Multiplex PCR 反應所使用的機器為 LABNET-9600G，PCR 反應液中含 1 $\mu$ l dNTP (2.5 mM)，1 $\mu$ l AAC\_ITS F (5  $\mu$ M)、1 $\mu$ l AAC\_ITS R (5  $\mu$ M)、0.5 $\mu$ l，0.5 $\mu$ l BG\_Uni\_ITS F (5  $\mu$ M)、0.5 $\mu$ l BG\_ITS\_IDR (5  $\mu$ M)，PEC\_Uni\_ITS F (5  $\mu$ M)、0.5 $\mu$ l PEC\_ITS\_R (5  $\mu$ M)及 2 $\mu$ l idgA start 5'F (5  $\mu$ M)、2 $\mu$ l idgA stop 3'R (5  $\mu$ M) 1 $\mu$ l template DNA 及，2 $\mu$ l 10X PCR reaction buffer，0.2  $\mu$ l Taq DNA polymerase (5U/ $\mu$ l)，並加入二次水至總體積為 20 $\mu$ l。反應的熱循環溫度及時間如下:先以 95 $^{\circ}$ C 變性反應 5 分鐘，接下來 95 $^{\circ}$ C 變性反應 30 秒，55 $^{\circ}$ C 黏合反應 60 秒，72 $^{\circ}$ C 延展反應 30 秒等三步驟進行 30 個循環複製，最後 72 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘。

## 參. 結果

### 一. 褐斑病菌之分析結果

#### (一). 褐斑病菌 ITS 序列核酸定序結果分析

參考 NCBI 資料庫之 *Acidovorax* 屬基因體中 16S rRNA 與 23S rRNA 之保留序列設計出 AA\_Uni\_ITS F 及 AA\_Uni\_ITS R 引子組 (表二)，分別針對 AAC 菌株進行 PCR 反應其電泳分析結果顯示，針對 16 株 AAC 菌株皆可複製出 683 bp 之 DNA 片段 (結果未顯示)。定序分析其中 5 株不同分離地點之分離株，菌株代號分別為 AAC4、AAC5、AAC6、AAC7 及 AAC9，定序結果以 NCBI 內 BLASTN 軟體比對分析其核酸序列後，可得知供試菌株 AAC4、AAC5、AAC6、AAC7、AAC8 及 AAC9 之 ITS 序列與 NCBI 資料庫中之 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (AY572032.1) 之 ITS 序列具有 99% 相似度，此筆結果可推測所使用之引子組可複製出為 AAC 之 ITS 片段。若將這些菌株之 ITS 序列以 ClustalW 軟體進行多序列分析比對，其結果顯示菌株 ITS 序列間之相似度為 98%。顯示所使用之引子組可利用 PCR 的方式複製出 AAC 菌株之 ITS 片段。

#### (二). 褐斑病菌專一性 ITS 引子組測試

分析蘭花細菌性病害 AAC、BG 及 PCH 菌株間 ITS 序列之相關性，利用生物資訊軟體 BLAST、EMBL-EBI 之 ClustalW，篩選具有特異性之序列設計出專一性引子組。本研究以 AAC 菌株之 ITS 序列設計出 AAC\_ITS\_F 與 AAC\_ITS\_R 專一性引子組 (表二)，針對 AAC 進行 PCR 反應，其 PCR 電泳分析結果得知所測試之 16 株 AAC 菌株，皆可複製出 518 bp 之 DNA 片段 (圖一)。為了進一步了解此引子組的專一性，以 PCR 測試表一內 BG 及 PCH 菌株，結果得知此引子組

針對 AAC 菌株之專一性檢測時皆可複製出 518 bp DNA 片段，而對 BG 及 PCH 之菌株則無法複製出專一性條帶(圖二)。

### (三). 褐斑病菌專一性 ITS 引子組靈敏度測試

在偵測靈敏度方面，利用專一性 AAC ITS 引子組，針對 AAC 菌株 AAC12 連續稀釋後之染色體 DNA，進行靈敏度測試之 PCR 反應，結果顯示此引子組針對 AAC 菌株可以偵測到的靈敏度介於 1 pg ~ 10 pg 的 DNA 濃度之間 (圖三 A)。菌體系列稀釋後以 PCR 進行測試發現本引子組之靈敏度可達  $10^3$  CFU (圖三 B)。

### (四). 褐斑病菌 *rpoB* 序列核酸定序結果分析

參考 NCBI 資料庫之 *rpoB* 基因序列相同區域所設計出 AAC\_*rpoB*\_Uni F 及 AAC\_*rpoB*\_Uni R 引子組，分別針對 AAC 菌株進行 PCR 反應其電泳分析結果，顯示針對所測試之 16 株 AAC 菌株皆可複製出 656 bp 之 DNA 片段 (結果未顯示)，顯示本引子應可複製出 AAC 菌株之 *rpoB* 基因片段。定序分析其中 3 株不同分離地點之分離株，菌株代號分別為 AAC17、AAC18 及 AAC19，定序結果以 NCBI 內 BLASTN 軟體比對分析其核酸序列後，可得知供試菌株 AAC17、AAC18 及 AAC19 之 *rpoB* 序列與 NCBI 資料庫中之 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (EU024247) 之 *rpoB* 序列具有 93% 相似度，此筆結果可推測所使用之引子可複製出 AAC 之 *rpoB* 基因。若將這些菌株之 *rpoB* 序列以 ClustalW 軟體進行多序列分析，其結果顯示菌株間之 *rpoB* 序列相似度為 99%。

### (五). 褐斑病菌專一性 *rpoB* 引子組測試

分析蘭花細菌性病害 AAC 及 BG 菌株間 *rpoB* 序列之相關性，利用生物資訊軟體 BLAST、EMBL-EBI 之 ClustalW，篩選具有特異性

之序列設計出專一性 AAC\_rpoB\_IDF 與 AAC\_rpoB\_IDR 引子組(表二)針對 AAC 菌株進行 PCR 反應，其 PCR 電泳分析結果得知所測試之 16 株 AAC 菌株，皆可複製出 274 bp 之 DNA 片段 (圖四)，為了進一步了解此引子的專一性以 PCR 測試表一內 BG 及 PCH 菌株，結果得知此引子組針對 AAC 菌株之專一性檢測時皆可複製出 274 bp DNA 片段，而對 BG 及 PCH 之菌株則無法複製出專一性條帶 (圖五)。

#### (六). 褐斑病菌專一性 *rpoB* 引子組靈敏度測試

在偵測靈敏度方面，利用專一性 AAC\_rpoB\_ID 引子組，針對 AAC 菌株 AAC12 連續稀釋後之染色體 DNA，進行靈敏度測試之 PCR 反應，結果顯示此引子組針對 AAC 菌株可以偵測到的靈敏度介於 10 pg~ 100 pg 的 DNA 濃度之間 (圖六 A)。菌體系列稀釋後以 PCR 進行測試發現本引子組之靈敏度可達  $10^4$  CFU (圖六 B)。

## 二. 葉斑病菌之結果分析

### (一). 葉斑病菌 ITS 序列核酸定序結果分析

參考 NCBI 資料庫之 *Burkholderia* 屬基因體中 16S rRNA 與 23S rRNA 之保留序列設計出 BG\_Uni\_ITS F 及 BG\_Uni\_ITS R 引子組，分別針對 BG 菌株進行 PCR 反應其電泳分析結果，顯示針對所測試之 22 株 BG 菌株皆可複製出 837 bp 之 DNA 片段 (結果未顯示)。定序分析其中 8 株不同分離地點之分離株，菌株代號分別為 OP1、OP2、HD2、HD10、HD18、HD21、PH1 及 PH6 定序之結果以 BLASTN 軟體比對分析其核酸序列後，可得知供試菌株 OP1、OP2、HD2、HD10、HD18、HD21、PH1 及 PH6 之 ITS 序列以 NCBI 內 BLAST 軟體分析比對得知 ITS 序列與 *Pseudomonas gladioli* (L28157.1) 之序列具有 98% 之相似度，此筆結果可推測所使用之引子可複製出 BG 之 ITS 片



段。若將這些菌株之 ITS 序列以 ClustalW 軟體進行多序列分析比對，結果顯示菌株之間比對結果相似度為 95%。

## (二). 葉斑病菌專一性 ITS 引子組測試

分析蘭花細菌性病害 AAC、BG 及 PCH 菌株間 ITS 序列之相關性，利用生物資訊軟體 BLAST、EMBL-EBI 之 ClustalW，篩選具有特異性之序列設計出 BG\_ITS\_IDR，而 BG\_Uni\_ITS F 端其序列不變(表二)，針對進行 PCR 反應，其 PCR 電泳分析結果得知所測試之 22 株 BG 菌株，皆可複製出 690 bp 之 DNA 片段(圖七)，為了進一步了解此引子的專一性以 PCR 測試表一內 AAC 及 PCH 菌株，結果得知此引子組針對 BG 菌株之專一性檢測時皆可複製出 690 bp 之 DNA 片段，而對 AAC 及 PCH 之菌株則無法複製出專一性條帶(圖八)。

## (三). 葉斑病菌專一性 ITS 引子組靈敏度測試

在偵測靈敏度方面，利用專一性 BG\_ITS\_ID 引子組，針對 BG 菌株 PH1 連續稀釋後之染色體 DNA，所進行靈敏度測試之 PCR 反應。結果顯示此引子組針對 BG 菌株可以偵測到的靈敏度介於 100 fg~1 pg 的 DNA 濃度之間(圖九 A)。菌體系列稀釋後以 PCR 進行測試發現本引子組之靈敏度可達  $10^1$  CFU(圖九 B)。

## (四). 葉斑病菌 gyrB 序列核酸定序結果分析

引用 Maeda 等人(2006)針對 BG 所設計之 gyrB 及 gla-FW 及 gla-RV。在本研究中將其命名為 BG\_gyrB\_IDF 及 BG\_gyrB\_IDR(表二)，針對 BG 菌株進行 PCR 反應，其電泳分析結果得知所測試之 BG 菌株皆可複製出 479 bp DNA 片段(圖十)。定序分析其中 6 株不同分離地點之分離株，菌株代號分別為 OP1、OP2、OP43、HD10、HD18、PH5 及 PH6，定序結果以 NCBI 內 BLASTN 軟體比對分析其核酸序

列後，可得知供試菌株 OP1、OP2、OP43、HD10、HD18、PH5 及 PH6 與 NCBI 資料庫中之 *Burkholderia gladioli* gyrB (AB220898.1) 序列之相似度具有 99%，此筆結果可推測所使用之引子組可複製出 BG 之 gyrB 基因。若將這些菌株之 gyrB 序列以 ClustalW 軟體進行多序列分析，其結果顯示菌株間之 gyrB 序列相似度為 98%。

#### (五). 葉班病菌專一性 gyrB 引子組測試

以 BG\_gyrB\_IDF 及 BG\_gyrB\_IDR 為引子 (表二)，針對表一內 AAC 及 PCH 菌株進行專一性測試，結果得知此引子組針對 BG 菌株之專一性測試時皆可複製出 479 bp DNA 片段，而對 AAC 及 PCH 之菌株則無法複製出專一性條帶 (圖十一)。

#### (六). 葉班病菌專一性 gyrB 引子組靈敏度測試

在偵測靈敏度方面，利用專一性 BG\_gyrB\_ID 引子組，針對 BG 菌株 PH1 之連續稀釋後染色體 DNA，進行靈敏度測試之 PCR 反應。其電泳分析結果顯示此引子組針對 BG 菌株偵測到的靈敏度介於 10 pg~100 pg 的 DNA 濃度之間 (圖十二 A)。菌體系列稀釋後以 PCR 進行測試發現本引子組之靈敏度可達  $10^3$  CFU (圖十二 B)。

#### (七). 葉班病菌 rpoD 序列核酸定序結果分析

分析 *Burkholderia* 屬菌株之間 rpoD 序列其相關性，利用生物資訊軟體 BLAST、EMBL-EBI 之 ClustalW，篩選具有特異性之序列設計出 BG\_rpoD\_60F 與 BG\_rpoD\_800R 引子組，分別針對 BG 菌株進行 PCR 反應，其電泳分析結果得知所測試之 22 株 BG 菌株，皆可專一性複製出 740 bp 之 DNA 片段 (圖十三)，顯示本引子組應可複製出 BG 菌株之 rpoD 基因片段。定序分析其中 7 株不同分離地點之分離株，菌株代號分別為 OP1、OP2、OP43、HD9、HD18、PH5 及 PH6

定序結果以 BLASTN 軟體比對分析其核酸序列後，可得知供試菌株 OP1、OP2、OP43、HD9、HD18、PH5 及 PH6 之 *rpoD* 序列與 NCBI 資料庫中之 *Burkholderia gladioli rpoD* (AB220906.1) 之 *rpoD* 序列具有 99% 之相似度，此筆結果可推測所使用之引子可複製出 BG 之 *rpoD* 基因。若將這些菌株之 *rpoD* 序列以 ClustalW 軟體進行多序列分析，其結果顯示菌株間之 *rpoD* 序列相似度為 100%。

#### (八). 葉班病菌專一性 *rpoD* 引子組測試

以 BG\_*rpoD*\_IDF 及 BG\_*rpoD*\_IDR 引子組(表二)，針對表一內 AAC 及 PCH 菌株進行專一性測試，結果得知此引子組針對 BG 菌株之專一性檢測時皆可複製出 740 bp 之 DNA 片段，而對 AAC 及 PCH 之菌株則無法複製出專一性條帶 (圖十四)。

#### (九). 葉班病菌專一性 *rpoD* 引子組靈敏度測試

在偵測靈敏度方面，利用 BG\_*rpoD*\_ID 引子組針對 BG 菌株 PH1 之連續稀釋後染色體 DNA 進行靈敏度測試。其電泳結果顯示此引子組針對 BG 菌株偵測到的靈敏度介為 10 pg ~100 pg 的 DNA 濃度之間 (圖十五 A)。菌體系列稀釋後以 PCR 進行測試發現本引子組之靈敏度可達  $10^2$  CFU (圖十五 B)。

### 三. 軟腐病菌之分析結果

#### (一). 軟腐病菌 ITS 序列核酸定序結果分析

參考 NCBI 資料庫之 *Erwinia* 屬基因體中 16S rRNA 與 23S rRNA 之保留序列設計出 PEC\_Uni\_ITS F 及 PEC\_Uni\_ITS R 引子，針對 PCH 菌株進行 PCR 反應其電泳分析結果顯示皆可複製出 567 bp 之 DNA 片段和三條不同大小之 DNA 片段 (結果未顯示)。其結果顯示所使用之引子組可利用 PCR 的方式複製出 PCH 菌株之 4 條 DNA 片段。定

序分析其中 4 株不同分離地點之分離株，菌株分別為 ECH12、ECH51、ECH52 及 ECH53，定序結果以 BLASTN 比對分析其核酸序列後，可得知供試菌株 ECH12、ECH51、ECH52 及 ECH53 之 ITS DNA 序列以 BLAST 軟體分析得知 ITS 序列與 *Pectobacterium chrysanthemi* (AF373202.1) 之序列具有 98% 之相似度，此筆結果可推測所使用之引子組可複製出 PCH 之 ITS 序列。若將這些菌株之 ITS 序列以 ClustalW 軟體進行多序列分析比對，其結果顯示菌株 ITS 序列間之相似度為 98%。

## (二). 軟腐病菌專一性 ITS 引子組測試

分析蘭花細菌性病害 AAC、BG 及 PCH 菌株間 ITS 序列之相關性，利用生物資訊軟體 BLAST、EMBL-EBI 之 ClustalW，篩選具有特異性之序列設計出專一性引子 PEC\_ITS\_R，而 PEC\_Uni\_ITS F 端其序列不變(表二)，針對 PCH 菌株進行 PCR 反應，電泳分析結果得知所測試之 5 株 PCH 菌株，皆可複製出 254 bp 之 DNA 片段(圖十六)，為了進一步了解此引子的專一性以 PCR 測試 AAC 及 BG 菌株，結果得知此引子組針對 PCH 菌株之專一性檢測時皆可複製出 254 bp DNA 片段，而對 AAC 及 BG 之菌株則無法複製出專一性條帶(圖十七)。

## (三). 軟腐病菌專一性 ITS 引子組靈敏度測試

在偵測靈敏度方面，利用專一性 PEC\_ITS 引子組，針對 PCH 菌株 ECH12 之連續稀釋後染色體 DNA，進行靈敏度測試之 PCR 電泳反應。結果顯示此引子組針對 PCH 菌株可以偵測到的靈敏度介於 10fg~100fg 的 DNA 濃度之間(圖十八 A)。菌體系列稀釋後以 PCR 進行測試發現本引子組之靈敏度可達  $10^3$  CFU(圖十八 B)。

#### (四). 軟腐病菌idgA序列核酸定序結果分析

引用朱(1995) 所設計 idgA start 5'F 及 idgA stop 3'R 為引子，針對 PCH 菌株進行 PCR 反應，電泳分析結果得知所測試之 5 株 PCH 菌株可分別複製出 950 bp (圖十九)，顯示所使用之引子組可複製出 PCH 菌株中之 idg 片段。定序分析其中 3 株不同分離地點之分離株，菌株分別為 ECH51、ECH52 及 ECH53，定序結果以 BLASTN 軟體比對分析其核酸序列後，可得知供試菌株 ECH51、ECH52 及 ECH53 之 idgA 序列與 NCBI 資料庫中之 *Pectobacterium chrysanthemi* (AF265211.1) 之序列具有 99%之相似度，此筆結果可推測所使用之引子組可複製出 PCH 之 ITS 序列 idgA 基因。若將 PCH 菌株之 idgA 序列以 ClustalW 軟體進行多序列分析，其結果顯示菌株間之相似度為 99%。

#### (五). 軟腐病菌idgA引子組測試

利用 idgA start 5'F 和 idgA stop 3'R 引子組(表二)，針對表一內 AAC 及 BG 菌株進行專一性測試，結果得知此引子組針對 PCH 菌株之專一性檢測時皆可複製出 950 bp DNA 片段，而對 AAC 及 BG 之菌株則無法複製出專一性條帶(圖二十)。

#### (六). 軟腐病菌idgA引子組靈敏度測試

在偵測靈敏度方面，利用 idgA start 5'F 及 idgA stop 3'R 引子組，針對 PCH 菌株 ECH12 之連續稀釋後染色體 DNA，進行靈敏度測試之 PCR 反應，結果顯示此引子組針對 PCH 菌株可偵測到的靈敏度介於 10 pg~ 100 pg 的 DNA 濃度之間 (圖二十一 A)。菌體系列稀釋後以 PCR 進行測試發現本引子組之靈敏度可達  $10^2$  CFU (圖二十一 B)。

#### (七). 軟腐病菌idgB序列核酸定序結果分析

引用朱(1995) 所設計 idgB start 5'F 和 idgB stop 3'R 引子組針對 PCH 菌株進行 PCR 反應，結果顯示針對所測試之 5 株 PCH 菌株皆可複製出 692 bp 片段 (圖二十二)，顯示所使用之引子組可複製出 PCH 菌株中之 idg 片段。定序分析其中 3 株不同分離地點之分離株，菌株分別為 ECH51、ECH52 及 ECH53，定序結果以 NCBI 內 BLASTN 軟體比對分析其核酸序列後，可得知供試菌株之 idgA 序列與 NCBI 資料庫中之 *Pectobacterium chrysanthemi* (AF265211.1) 之序列具有 99% 之相似度，此結果可進一步確認所設計之引子可複製出 PCH 之 idgA 基因。若將這些菌株之 idgB 序列以 ClustalW 軟體進行多序列分析，其結果顯示菌株間之相似度為 99%。

#### (八). 軟腐病菌idgB引子組測試

利用 idgB start 5'F 和 idgB stop 3'R 引子，針對表一內 AAC 及 BG 菌株進行專一性測試，結果得知此引子組針對 PCH 菌株之專一性檢測時皆可複製出 692 bp DNA 片段，而對 AAC 及 BG 之菌株則無法複製出專一性條帶 (圖二十三)。

#### (九). 軟腐病菌idgB引子組靈敏度測試

在偵測靈敏度方面，利用 idgB start 5'F 及 idgB stop 3'R 引子組針對 PCH 菌株 ECH12 之連續稀釋後染色體 DNA，進行靈敏度測試之 PCR 反應，結果顯示此引子組針對 PCH 菌株可偵測的靈敏度介於 1 pg~10 pg 的 DNA 濃度之間 (圖二十四 A)。菌體系列稀釋後以 PCR 進行測試發現本引子組之靈敏度可達  $10^3$  CFU (圖二十四 B)。

### 四. 多引子組之分析結果

#### (一). 多引子 PCR 在褐斑病菌之檢測應用

測試褐斑病菌之 Multiplex PCR 反應，在同一管 PCR tube 內分別加入 AAC ITS 和 AAC\_rpoB\_ID 之引子組針對 AAC 菌株進行 PCR 反應，其測試結果顯示分別可以複製出 518 bp 及 274 bp 之專一性條帶，其結果顯示所使用之引子組可在同一管 PCR tube 中鑑定 AAC 菌株 (圖二十五)。

#### (二). 多引子 PCR 在葉斑病菌之檢測技術應用

測試葉斑病之 Multiplex PCR 反應，在同一管 PCR tube 內分別加入 BG ITS、BG\_gyrB 和 BG\_rpoD 之引子組針對 BG 菌株進行 PCR 反應，其測試結果分別可複製出 690 bp、479 bp 及 740 bp 之專一性條帶，電泳分析結果顯示所使用之引子組可在同一管 PCR tube 中鑑定 BG 菌株 (圖二十六)。

#### (三). 多引子 PCR 在軟腐病菌之檢測應用

測試軟腐病菌之 Multiplex PCR 反應，在同一管 PCR tube 內分別加入 PEC ITS、idgA 和 idgB 之引子組針對 PCH 菌株進行 PCR 反應，其測試結果分別可複製出 254 bp、950 bp 及 692 bp 之專一性條帶，電泳分析結果顯示所使用之引子組可在同一管 PCR tube 中鑑定 PCH 菌株 (圖二十七)。

#### (四). 多引子 PCR 在褐斑病菌、葉斑病菌及軟腐病菌專一性 ITS 及 idgA 之檢測應用

以 AAC ITS、BG ITS、PEC ITS 及 idgA 引子組分別針對混合後之(1). AAC9、OP5 及 ECH3、(2). AAC12、HD15 及 ECH12 和(3). AAC13、PH5 及 ECH15 之染色體 DNA 進行 PCR 反應，其測試結果顯示可分別複製出 518 bp、690 bp、254 bp 及 950 bp 之專一性條帶，電泳分析結果顯示所使用之引子組可在同一管 PCR tube 中鑑定 AAC、BG 及 PCH 菌株(圖二十八)。

#### 肆. 討論

行政院所公佈的『挑戰 2008 國家發展重點計劃』中，有花卉生物科技園區的設置計劃，利用我國蘭花產業的優越條件，增加台灣花卉在國際花卉市場的競爭力，蘭花為最重要外銷花卉，亦被農委會遴選為外銷之旗艦作物，若能符合各國病害檢疫的要求，將可提升蘭花產業之外銷競爭力。造成台灣蝴蝶蘭細菌性病害的種類有三種，分別為蝴蝶蘭細菌性褐斑病、蝴蝶蘭細菌性葉斑病及蝴蝶蘭細菌性軟腐病。當蝴蝶蘭受到病菌之感染，將會影響蘭花的品質及產量，同時對出口亦造成相當重要之影響。細菌性病害檢測，通常會依據病徵、罹病組織之顯微鏡檢查、細胞型態、菌落特性、生理生化特性、biolog 鑑定、血清技術 (Klopmeier and Kelman, 1988 ; Phillips and Kelman, 1982)、噬菌體感受性 (Gross et al., 1991)等方式來進行，但專一性及靈敏度較差、所需成本較高且費時等限制因子存在。近年來由於分子生物技術之快速發展，諸如單元抗體血清測定、核酸探針 (Cook and Sequeir, 1991 ; Denny, 1988)及聚合酵素連鎖反應技術，提供更佳之檢測方法。其中 PCR 技術具有高專一性及靈敏度，只需很短的時間及少數樣品量即可得到結果，已成為植物病害診斷、鑑定及偵測病原菌必要之工具 (Miller et al., 1988 ; Henson and French, 1993 ; Fenby et al., 1995 ; Singh, 1998)。本研究利用生物資訊及分子生物技術進行專一性引子組的開發以發展 PCR 檢測技術，目前針對 ITS、rpoB、rpoD、gyrB、idgA、idgB 等核酸片段都可篩選出具有檢測效果之引子組。

##### 一. ITS專一性引子組之開發

將 AAC4、AAC5、AAC6、AAC7、AAC8 及 AAC9 之 ITS 序列與 NCBI 內所建立之資料庫進行 BLASTN (AY572032.1) 比對相似度達 99%，進行多序列比對結果相似度達 98 %，由此可知其 ITS 具有



高度的保留性，目前只針對蝴蝶蘭上所分離到之 AAC 菌株進行 PCR 測試，其偵測率為 100% (16/16)。目前本實驗室將 AAC ITS 引子組針對從水稻及玉米條斑病所分離出來之 *A. avenae* subsp. *avenae* 菌株進行檢測時發現可複製出 519 bp 之 DNA 片段，將結果進行定序分析並與 NCBI 資料比對發現與 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* 之 ITS 序列 (AY080996.1) 有 98% 的相似，而將解序之 AAC ITS 序列與 *A. avenae* subsp. *avenae* 序列進行多序列比對發現序列間的相似度為 98%，從序列中可以觀察到感染在水稻與玉米之 *A. avenae* subsp. *avenae* 序列與感染在蘭花上 *A. avenae* subsp. *cattleyae* 之 ITS 之序列間有些許差異存在。後續之研究可以嘗試將 AAC ITS 用於感染在其他宿主之褐斑病偵測應用上，並且加以設計出專一性引子組。宋 (1999) 針對瓜類細菌性果斑病菌之聚合酵素連鎖反應技術針對 *A. avenae* subsp. *citrulli* 設計之專一性引子 SL1/SR1 其靈敏度為 100 pg。王與鄭 (2001) 針對瓜類細菌性果斑病菌血清偵測技術提到利用間接 ELISA 和 DAS-ELISA 針對 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* 之靈敏度結果顯示，分別可以偵測到  $10^4$  和  $10^5$  CFU。而本研究所使用之 AAC ITS 專一性引子，可偵測到之靈敏度為 1 pg~10 pg 的全 DNA 量或  $10^3$  CFU。

在蘭花細菌性葉斑病菌之研究，首先利用共通性引子組 BG\_Uni ITS，針對 9 株 BG 菌株分別為 OP1、OP2、OP43、HD2、HD10 HD18、PH1、PH2 及 PH6 複製出 837 bp 之 DNA 片段 (結果未顯示)，將其 PCR 產物定序分析與 NCBI 資料庫 (L28157.1) 比對相似度達 98%，而進行多序列比對結果發現 HD 與 PH 之間序列相似度為 98%，HD 與 OP 之間序列相似度為 95%，而 PH 與 OP 之間序列的相似度為 94%，懷疑在同種之間可能因為感染宿主或地理來源不同而

導致 ITS 序列之間有些許差異存在。本研究利用共通性引子組 BG\_Uni\_ITS 針對蘭園所分離出來之未知菌株進行 RCR 反應，PCR 結果發現可以複製出 4 條不同大小之 DNA 片段，由大到小分別編號 (A) 879 bp、(B) 823 bp、(C) 671 bp 及 (D) 590 bp 之 DNA 片段，其定序分析結果發現與 *Burkholderia cenocepacia* 序列相似度為 97%，將所分離之菌株送至台南區農業改良場進行生理生化及 biollog 測試其結果顯示所分離到之菌株可能為 *Burkholderia pyrrocinia*，後續可以做進一步之探討與分析。

目前針對蝴蝶蘭上所分離到之 BG 菌株，使用 BG\_ITS 引子組進行 PCR 反應，結果發現 BG 菌株代號 OP1、OP2、OP43 及 HD16 有兩條相近不易區分條帶，大小分別為 (A) 793 bp 與 (B) 690 bp 之 DNA 片段，而其他 BG 菌株均只有單一條帶出現，從菌株資料得知 OP1、OP2 及 OP43 是由文心蘭葉片所分離到的菌株，再回接蝴蝶蘭上所分離之病原菌，而 HD16 是由 OP43 之菌株再回接到蝴蝶蘭上所分離的菌株，將其 OP1 所 PCR 之產物 (A) 與產物 (B) 送定序分析結果發現產物 (A) 與 NCBI 資料相比其結果顯示與 *Burkholderia gladioli* strain HN2y 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (EF552060.1) ; and tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence 之相似度為 98%。而產物 (B) 與 NCBI 資料相比其結果顯示與 *Burkholderia gladioli* strain Co14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence (EF552065.1) 之相似度為 98%，產物 (A) 與產物 (B) 之進行多序列比對結果發現相似度為 98%。

在蘭花細菌性軟腐病菌之研究，使用共通性引子組 PEC\_Uni\_ITS，針對 ECH 進行 PCR 反應，結果發現可以複製出 4 條不同大小之片段，以片段由小到大的編號為 (A) 561 bp、(B) 713 bp、(C)

900 bp 及(D)1300 bp，本研究目前僅將序列(A)與(B)送定序分析，其分析結果(A)序列與 NCBI 資料庫內之 (AF373202) 相似度為 98%，序列(B)與 NCBI 資料庫內之 (AF234285) 相似度為 99%。將序列(A)與序列(B)進行多序列比對結果兩組引子之間的相似度為 86%。其結果得知本實驗進行 PCR 反應時所使用之共通引子會隨機結合在 genomic DNA 之片段上，但使用共通性引子即可明顯的區分出 ECH 及 ECC 之菌株。

目前在台灣病毒及軟腐菌感染，是全世界蘭花業者最頭痛的問題，而目前台灣已經開發出利用 Multiplex RT-PCR 及晶片的方式來檢測病毒，在細菌方面大多數的檢測是以 ECC 及 ECH 之分類為主，許等學者 (2007) 針對彩色海芋之 ECC 及蝴蝶蘭之 ECH 所設計之 Ec3F/Ec3R 之引子可以同時鑑定並區分 ECC 與 ECH 之引子其靈敏度 10~50ng 或 12 個 CFU。蔡 (1998) 以 5A/5B 及 Ec1/Ec2 等引子可偵測到 ECH 之最低菌數為  $5.2 \times 10^1$  CFU。本研究針對 ECH 之鑑定利用三對引子組不僅花費較低、檢測所需的時間只需 2-3 個小時、而且減少偽陽性的出現、加強檢測的可信度。

## 二. rpoB及rpoD專一性引子組之開發

本研究實驗設計時希望利用 ITS 鑑定的同時，可以尋找具有高度保留性和足夠變異性之 Housekeeping 基因或是 Protein-coding 基因來協助病原菌之鑑定，減少檢測偽陽性的出現已增加檢測技術之可信度與準確度。本研究參考 NCBI 資料庫中 AAC、BG 及 PCH 之 rpoB 基因進行比對，針對 AAC 設計出 AAC\_rpoB\_ID 之專一性引子組。在 AAC 的偵測應用上，將 AAC17、AAC18、及 AAC19 之 rpoB 序列與 NCBI 所建立之資料庫進行 BLAST 比對相似度達 93%，而進行多序列比對結果相似度達 99%，由此可知此片段具有高度的保留性，

針對蝴蝶蘭上所分離到之 AAC 菌株進行 PCR 測試其偵測率為 100% (16/16)，可偵測到之靈敏度為 10 pg~100 pg 全 DNA 量或  $10^4$ CFU。

分析 *Burkholderia* 屬內之 *rpoD* 基因針對 BG 設計出 BG\_ *rpoD* 引子組，在 BG 的偵測應用上，將 OP1、OP2、OP43、HD9、HD18、PH5 及 PH6 之 *rpoD* 序列與 NCBI 所建立之資料庫進行 BLAST 比對相似度達 100%，而進行多序列比對結果相似度達 99%，由此可知此片段具有高度的保留性，針對蝴蝶蘭所分離到之 BG 菌株進行 PCR 測試其偵測率為 100% (22/22)，可偵測到之靈敏度為 10pg ~100pg 的 DNA 濃度或  $10^2$ CFU。在遺傳多樣性分析方面使用 *rpoB* 及 *rpoD* 基因可以作為一種生物指標，而且序列保留度又高，適合用於 Nested-PCR、PCR-DGGE 或 TTGE 等相關的檢測 (Dahllöf et al., 2000)。

### 三. *gyrB* 專一性引子組之開發

王等學者 (2008) 在生物資源保存及研究簡訊中提到 *gyrB* 基因可以成功區別類緣關係相近菌種之間與種內菌株之間甚至不同族群之間的差異，且區分能力明顯，可以作為研究細菌演化和菌種分類鑑定之理想分子。本研究所使用 BG\_ *gyrB*\_ID 引子組是引用 Maeda 等學者 (2006) 針對三種會感染植物之 *Burkholderia* 屬細菌進行親緣關係之研究與多引子 PCR 鑑定。在 BG 的偵測應用上，將 OP1、OP2、OP43、HD10、HD18、PH5 及 PH6 之 *gyrB* 序列與 NCBI 所建立之資料庫進行 BLAST 比對相似度達 99%，而進行多序列比對結果相似度達 98%由此可知此片段具有高度的保留性，針對蝴蝶蘭所分離到之 BG 菌株進行 PCR 測試其偵測率為 100% (22/22)，可偵測到之靈敏度為 10 pg ~100 pg 的 DNA 濃度或  $10^3$ CFU。目前 *gyrB* 基因已被使用來分析 *Mycobacteria*、*Bacillus*、*Enterobacteriaceae*、*Helicobacter*、*Vibrio*

等菌屬內的相近物種的類緣關係及快速鑑定上，沈 (2006) 在 *Gordonia* 菌屬放線菌之分子偵測、分類及鑑定上利用 16S rDNA 與 *gyrB* 基因設計出 G268F/G1096R 及 G699F/G1134R 之特異性引子進行 PCR 增殖及定序引子，結果針對 *Gordonia* 菌屬與七種鄰近放線菌的 *gyrB* 基因序列其相似度介於 72.8%-82.1%，而 16S rDNA 序列的相似度介於 96.2%-99.7%，由上述結果可得知 16S rDNA 保留度極高，而 *gyrB* 基因之變異程度無論在菌屬、菌種甚至各分離株間均較 16S rRNA 基因大，很適合用來作為分類及快速鑑定之依據。

#### 四. *idgA*及*idgB*專一性引子組之開發

本研究使用 PEC\_ITS 引子組進行 PCR 反應時發現當黏合溫度小於 58°C 時有時會有偽陽性的結果出現，希望加以使用 ECH 之相關基因來提高鑑定之可信度，而在 *Erwinia* 屬軟腐細菌中目前發現僅有 *E. chrysanthemi* 培養在 YDC 培養基上可產生藍色素 (Indigoidine)，使其菌落形成藍色是鑑定上之一重要特性(Dickey and Kelman, 1988；朱，1995)。朱 (1995) 在 *Erwinia chrysanthemi* 之遺傳差異性藍色素基因選殖及 PCR 偵測的研究中，針對 ECH 之 RA3B 選殖出藍色素合成之相關基因 *argG*、*idgA*、*idgB*、*idgC*、*pecS* 及 *pecM* 目前已經發表於 NCBI 之資料庫中(AF265211)。本研究利用藍色素基因之 *idgA* 及 *idgB* 特異性序列針對 ECH 菌株進行 PCR 反應。在 PCH 的偵測應用上，將 ECH51、ECH52、及 ECH53 之 *idgA* 及 *idgB* 序列與 NCBI 所建立之資料庫進行 BLAST 比對相似度達 100%，而進行多序列比對結果相似度達 100%，由此可知此片段具有高度的保留性。將 *idgA* 引子組針對蝴蝶蘭、文心蘭及嘉德利亞蘭上所分離到之 PCH 菌株進行 PCR 測試其偵測率為 100% (5/5)，可偵測到之靈敏度為 100 pg ~10 pg 全 DNA 量或 10<sup>2</sup>CFU。*idgB* 專一性引子其靈敏度，最低可偵測到 10

pg~ 1 pg 的全 DNA 量或  $10^2$ CFU。

## 五. Multiplex PCR檢測技術之開發

利用 PCR 反應進行大量檢測時，以單一引子組的方式不僅耗時，而且必須以多管的方式才可以確定並且區分三種病原菌之存在。所以本研究將具有檢測效果之引子組利用多引子 PCR 的方式，進行單一病原菌之檢測及同時區分三種不同病原菌之檢測。細菌性褐斑病菌之多引子 PCR 反應是利用 AAC ITS /AAC\_rpoB\_ID 引子組針對 AAC 菌株進行 PCR 反應，結果顯示測試 6 株 AAC 菌株皆可分別複製出專一性片段。目前本研究使用 AAC ITS 及 AAC\_rpoB\_ID 引子組檢測從大林育品蘭園所採集之疑似細菌性褐斑病之蘭花，結果顯示可以複製出二條專一性條帶，將分離之菌株送至台南區農業改良場進行生理生化測試及 biolog 測試後確定為 AAC，代號為 YP-AAC01。由上述結果得知 AAC ITS /AAC\_rpoB\_ID 引子組可以利用 Multiplex PCR 的方式快速且專一性的檢測出 AAC 菌株，後續可以用來協助細菌性褐斑病之檢測與菌株分離。細菌性葉斑病菌之多引子 PCR 反應，利用 BG ITS /BG\_gyrB /BG\_rpoD 引子組針對 BG 菌株進行 PCR 反應，電泳結果發現有條帶模糊無法區分或是無法複製條帶的情況產生，懷疑可能是因為 BG ITS (690 bp) 及 BG\_rpoD (740 bp) 大小僅相差 50 bp 或是效價強度不同而導致。所以在進行 PCR 時，將 BG ITS 引子組的量減少為  $1\mu\text{l}$ ，並且提高黏合的時間到 40 秒，並以 2.5% 之 agarose gel 進行電泳分析，才可出現清楚區分之條帶。本實驗室使用 BG ITS /BG\_gyrB /BG\_rpoD 引子組以 PCR 反應檢測從台南區農業改良場採集疑似細菌性葉斑病之蘭花，其結果顯示可以複製出三條專一性條帶，將分離之菌株送至台南區農業改良場進行生理生化及 biolog

檢測後確定為 BG，編號為 YPS-112。結果顯示可以使用 BG\_ITS /BG\_gyrB/BG\_rpoD 引子組快速且專一的檢測出 BG 菌株，後續可以用來協助細菌性葉斑病之檢測與菌株分離。軟腐病菌之多引子 PCR 反應，利用 ECH\_ITS/idgA/idgB 引子組針對 ECH 進行 PCR 反應，結果顯示可以分別增幅出三條專一性條帶，目前使用 ECH\_ITS /idgA /idgB 引子組檢測從台南長榮蘭園採集葉片腐爛之蘭花進行 PCR 反應，結果分別可以增幅出專一性條帶，將分離之菌株送至台南區農業改良場進行生理生化及 biolog 檢測後確定所分離之菌株為 ECH，編號為 ECH15。由上述結果得知使用 ECH\_ITS /idgA /idgB 之引子組進行 PCR 反應，可以縮短檢測的時間。同時使用此三對 ITS 引子組與三種菌株進行 Multiplex PCR，結果發現背景會產生模糊之現象而導致條帶不清楚，多次結果都是呈現此種現象，但是在加入 idgA 後以同樣的條件進行 Multiplex PCR 反應，電泳結果背景卻是很乾淨而且條帶明顯，造成背景模糊之原因還可待進一步的討論。

本研究中採取健康的蘭花葉片研磨後加以離心，附著在葉片上之腐生菌或是真菌會因離心而沉澱，所以在測試時，並不會有干擾的現象產生。但是實際應用於田間檢測時，土壤中的腐生菌、葉片中的殘渣是否會導致干擾的現象產生，是需要被注意且探討的。後續實驗中將水及葉液分別加入  $10^8$ CFU 之菌液進行 Multiplex PCR 反應結果發現水與葉液所呈現的電泳結果相同，結果表示葉液內的成份並不會影響檢測的結果。而在測試的過程中也加入腐生菌進行 PCR 反應，結果顯示腐生菌並不會影響到檢測的結果。目前已經可以利用輔助之 rpoB、rpoD、gyrB、idgA 及 idgB 來減少偽陽性的出現並且加強鑑定之可信度。比起傳統檢測技術利用 Multiplex PCR 不僅成本低廉、檢測時間只需 2-3 個小時、而且利用多組引子可以提高鑑定之可信度，

減少偽陽性的出現。

## 六. 總結

研究成果發現應用 PCR 與 Multiplex PCR 的技術可準確地偵測蘭花上常見之多種細菌性病害病原菌之存在並加以分離、保存、調查及追蹤，並希望將此應用於改良溫室栽培管理技術，期望能減少蘭花細菌性病害之發生，並提高蘭花細菌性病害之檢疫技術，使業者所生產之蘭花能通過檢疫並順利取得外銷之訂單，提高蘭花的外銷競爭力。本研究發展及建立準確、敏感、快速與簡便的鑑定技術，可以為我國的蘭花產業做最嚴密的把關工作，減少蘭花業者的損失，更重要的是可為台灣蘭花品質取得在國際上的信賴，這將會大量提高我國往後蘭花的產量，相對的對我國蘭花產業的擴展也是一項很大的助益。



## 伍. 參考文獻

- 王志傳。1984。狐狸尾蘭軟腐細菌之生態。國立中興大學植物病理學研究所碩士論文。台中。
- 王俐婷。2008。以 *gyrB* 基因序列分析鑑別產業用枯草桿菌群之學名。生物資源保存及研究簡訊 21(1)，2-3。
- 朱木貴。1995。*Erwinia chrysanthemi* 之遺傳差異性、藍色素基因選殖及 PCR 偵測。國立中興大學植物病理學研究所博士論文。台中。
- 行政院農業委員會。2007。95 年農業統一年報。行政院農業委員會編印。台北。319 頁。
- 宋一鑫、吳雅芳、陳耀煌、陳紹崇、林明瑩、陳昇寬、鄭安秀。2006。環控設施栽培之蝴蝶蘭落蕾現象。植保會刊 48，65-70。
- 李一芸。1994。臺灣彩色海芋細菌性軟腐病之研究。國立中興大學植物病理學研究所碩士論文。台中。
- 李宜映、林海珍。2007。國內植物種苗生技之研究發展概況-以蝴蝶蘭為例。農業生技產業季刊-植物種苗生技 9，19-24。
- 林長平、徐仕美。2002。以 16S-23S rDNA spacer 核酸序列分析台灣植物菌質體之親緣關係。植物病理學會刊 11 (4):199-206。
- 張清安、曾雅詩、陳金枝、鄧汀欽。1999。應用聚合酶連鎖反應及核酸探針雜配法偵測齒舌蘭輪斑病毒。植病會刊 8，29-36。
- 張清安。2005。健康的蘭花種苗。科學發展-植物保護生技 392，16-25。
- 曹麗玉。2004。蝴蝶蘭常見病害(下)。豐年 54 (24)，37-41。
- 許秀惠、申屠萱、曾國欽、林俊義。2007。鑑別 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 及 *Erwinia chrysanthemi* 細菌性軟腐病菌專一性引子之開發。植病會刊。16，19-29。
- 許秀惠、宋秉峰、吳俊瑋、施淑晴、林俊義。2004。向日葵細菌性軸

- 腐病之特性、品種抗性及藥劑篩選。植保會刊 46: 367-378。
- 許秀惠、曾偉凡、賴婉綺、潘雅碧、林俊義。2008。 *Burkholderia gladioli* 引起之鳳梨果腐病。植病會刊 17: 157-167。
- 許秀惠。1998。花卉細菌性病害之特性與簡易診斷法。臺灣花卉園藝 129, 44-53。
- 陳文輝。2002。蝴蝶蘭的品種改良。科學發展 351, 32-39
- 陳任芳。1993。蘭花病蟲害認識和防治-病害篇。花蓮區農業專訊 3:6-9。
- 陳姍姍。1991。 *Erwinia* 屬軟腐細菌在馬鈴薯與水稻輪作田之分佈及影響其存活之因子。國立中興大學植物病理學研究所碩士論文。台中。
- 陳昭鑑。2003。以核糖體核酸基因內轉錄區序列及寡核苷酸微矩陣晶片鑑定臨床致病性鏈球菌。成功大學醫事技術系碩士學位論文。台南。
- 彭成立。2008。臨床實驗室利用 16S rRNA 基因定序來鑑定細菌的優點、缺點與可能誤判的陷阱。台北市醫事檢驗師公會醫檢會刊 3-5 頁。
- 曾國欽、徐世典、蔡金池、梁玲嫻。1981。臺灣馬鈴薯 *Erwinia* 屬軟腐細菌的特性。植保會刊 30: 417。
- 曾國欽、陳姍姍、徐世典。1994。 *Erwinia* 軟腐細菌在馬鈴薯與水稻輪作田之存在情形。植病會刊 3: 175-180。
- 曾國欽、徐世典。2003。重要植物細菌性病害之診斷。鑑定植物重要防檢疫病害診斷鑑定技術研習會專刊(二) 95-115 頁。
- 曾國欽。1993。蔬菜細菌性軟腐病。蔬菜保護研討會專刊。中華植物保護學會 321-240 頁。

- 馮靖廷。2005。粗肋草細菌性軟腐病病原菌之鑑定及其病害防治之研究。國立屏東科技大學植物保護系碩士班碩士學位論文。屏東。
- 黃秀華。1994。國蘭病害之簡介。台中區農推專訊 138 期。
- 黃秋萍。2006。蝴蝶蘭逆境之生理及分子層次特性分析。國立成功大學生命科學研究所碩士論文。台南。
- 黃德昌。2005。植物保護-蘭花細菌性病害。台灣農家要覽－農作篇(三)。246-248 頁。
- 蔡米皓。2000。火鶴花細菌性葉枯病之分離、偵測與防治。國立中興大學植物病理學研究所碩士論文。台中。
- 蔡佳玲。1998。應用聚合酶連鎖反應技術偵測台灣 *Erwinia* 軟腐細菌。國立中興大學植物病理學研究所碩士論文。台中。
- 蔡奇助、黃柄龍、陳富永、蘇育彥。2005。天然雜交種蝴蝶蘭 *Phalaenopsis* × *intermedia*。高雄區農業改良場研究彙報 16 (3)，15-36。
- 鄭尤琇、陳慶忠、沈炳男、詹富智。2008。台灣蝴蝶蘭之新興病毒病害。植物重要防疫檢疫病害診斷鑑定技術研習會專刊(七) 11-17 頁。
- 鄭安秀、陳紹崇、吳雅芳、彭瑞菊。2006。有機作物栽培之病害管理技術。農政與農情第 167 期。
- 鍾文鑫。1992。台灣青蔥軟腐病之研究。國立中興大學植物病理研究所碩士論文。台中。
- 蘇秋竹、呂理燦、曾國欽。1996。*Erwinia chrysanthemi* 引起之唐菖蒲細菌性軟腐病。植病會刊 5: 209。
- 蘇秋竹。1997。文心蘭細菌性病害之特性與防治。高雄區農業專訊 22:14-15。

吳錦勳、李穎盈。2007。一間公司，幹掉一個王國。商業週刊。1026，  
106-119。

Andy, P., Braat, C. E., Saindon, G., Haung, H. C., and Laroche, A. (1996).  
A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of  
bacteria causing common and halo blights in bean seed.  
Phytopathological 86, 361-366.

Arditti, J. (1992). Classification and naming of orchids. *In*: Fundamentals  
of Orchid Biology. p.55-101, John Wiley and Sons, Inc. U.S.A.

Arias, R. S., Murakami, P. K., and Alvarez, A. M. (1998). Rapid detection  
of pectolytic *Erwinia* sp. in *Aglaonema* sp. Hort Techonology 8,  
602-605.

Avrova, A.O., Hyman, L.J., Toth, R.L., and Toth, I.K. (2002). Application  
of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for  
taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia*  
*carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. Appl Environ Microbiol 68,  
1499-1508.

Bauernfeind, A., Schneider, I., Jungwirth, R., and Roller, C.(1998).  
Discrimination of *Burkholderia gladioli* from other *Burkholderia*  
species detectable in cystic fibrosis patients by PCR. Clin. Microbiol.  
36, 2748-2751.

Bautz, E. K., and Dunn, J. J. (1969). DNA-dependent RNA polymerase  
from phage T4 infected E. coli: an enzyme missing a factor required  
for transcription of T4 DNA. Biochem. Biophys Res Commun 34,  
230-237.

Boccaro, M., Vedel, R., Lalo, D., Lebrun, M. H. and, and Lafay, J.F.  
(1991). Genetic diversity and host range in strains of *Erwinia*  
*chrysanthemi*. Molecular Plant and Microbial Interaction 4, 293-299.

Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Miklos, G. V., and Fanning, G. R. (1973).

- Deoxyribonucleic acid relatedness among *Erwinia* and other Enterobacteriaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23, 205-216.
- Chuang, M. F., Tzeng, K. C., and Hsu, S. T. (1989). Soft rot of radish caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Prot. Bull.* 31, 358-365.
- Ciardo, D. E., Schar, G., Bottger, E. C., Altwegg, M., and Bosshard, P. P. (2006). Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. *Clin. Microbiol.* 44(1), 77-84.
- Cirvilleri, G., Bonaccorsi, A., Vitale, A., Castello, I., and Polizzi, G. (2006). First report of leaf spot and blight of *Strelitzia reginae* caused by *Burkholderia gladioli* in Italy. *Plant Dis.* 90, 1553.
- Clark, C. A., Wilder-Ayers, J. A. and Duarte, V. (1989). Resistance of sweet potato to bacterial root and stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Dis.* 73, 984-987.
- Cook, D., and Sequeira, L. (1991). The use of subtractive hybridization to obtain a DNA probe specific for *Pseudomonas solanacearum* race 3. *Mol. Gen. Genet.* 227, 401-410.
- Cuppels, D. A., and Kelman, A. (1974). Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue. *Phytopathol.* 64, 468-475.
- Darrasse, A., Priou, S., Kotoujansky, A., and Bertheau, Y. (1994). PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1437-1443.
- Dickey, R. S. (1979). *Erwinia chrysanthemi*: A comparative study of phenotypic properties of strains from several hosts and other *Erwinia* species. *Phytopathol.* 69, 324-329.
- Dickey, R. S., and Kelman, A. B. (1988). *Erwinia* 2. "Carotovora" or soft

- rot group. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd ed. N. W. Schaad ed. APS press. Phytopathological St. Paul, MN. P. 44-59.
- Duncan, J. M., and Torrance, L. (1992). Techniques for the rapid detection of plant pathogens. Pages 7-114. *In: Immunological Techniques*. Blackwell Scientific Publications, London, p.235.
- Elazri-Volcani, B. (1939). On *Pseudomonas indigofera* (Voges) Migula and its pigment. Arch. Mikrobiol. 10, 343-358.
- Elphinstone, J. G., and Pérebelon, M. C. M. (1986). Contamination of potatoes by *Erwinia carotovora* during grading. Plant Pathol. 35, 25-33.
- Euzéby, J. P. (2004). List of bacterial names with standing in nomenclature -Genus *Pectobacterium*. Centre Interuniversitaire de Calcul de Toulouse:Author. Retrieved January 31, 2004, from the World Wide Web: <http://www.bacterio.cict.fr/p/pectobacterium.html>.
- Fegan, M., Corft, B. J., Teakle, D. S., Hayward, A. C., and Smith, G. R. (1998). Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane with a polymerase chain reaction- based assay. Plant Pathol. 47, 495-504.
- Feistner, G. (1990). Pigments. *In: Klement Z, Rudolph K and Sands DC*, eds. *Methods in Phytobacteriology*. Budapest: Akadémiai Kiado; p233-244.
- Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., and Samson, R. (2003). Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 381-391.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., and Nash, H. A. (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. Proc.

- Natl. Acad. Sci. USA. 73, 3872-3876.
- Giacomazzi, S., Leroi, F., L'Henaff, C., and Joffraud, J. J. (2004). rpoB-PCR amplified gene and temporal temperature gradient gel electrophoresis: a rapid tool to analyse bacterial strains representative of cold-smoked salmon microflora. Lett. Appl. Microbiol. 38 , 130-134.
- Gross, D. C., Powelson, M. L., Regner, K. M., and Rademaker, G. K. (1991). A bacteriophage-typing system for surveying the diversity and distribution of strains of *Erwinia carotovora* in potato field. Phytopathol. 81, 220-226.
- Hartung, J. S., Daniel, J. F., and Pruvost, O. P. (1993). Detection of *Xanthomonas campestris* pv. citri by the polymerase chain reaction method. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1143-1148.
- Hartung, J. S., Pruvost, O. P., Villemot, I., and Alvarez, A. (1996). Rapid and sensitive colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri by immunocapture and a nested-polymerase chain reaction assay. Phytopathol. 86, 95-101.
- Hauben, L., Moore, E. R. B., Vauterin, L., Steenackers M., Mergaert J., Verdonck L., and Swings J. (1998). Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. Syst. Appl. Microbiol. 21(3), 384-97.
- Henson, J. M., and French, R. (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annu. Rev. Phytopathol. 31, 81-109.
- Hildebrand, D. C., Palleroni, N. J., and Doudoroff M. (1973). Synonymy of *Pseudomonas gladioli* Severini 1913 and *Pseudomonas marginata* (McCulloch 1921) Stapp 1928. Int J Syst Bacteriol. 23, 433-437.
- Hillis, D. M., and Dixon, M. T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Quart. Rev. Biol. 66(4), 411-53.
- Hseu, S. H. (1994). The bacterial diseases of flower and ornamental

- foliage plants in Taiwan. The Plant Protection Society of the Republic of China Special Publication New 2, 63-75. (Taiwan, R.O.C., in Chinese).
- Hu, F. P., Young, J. M., Triggs, C. M., Park, D. C., and Saul, D. J. (2001). Relationships within the Proteobacteria of plant pathogenic *Acidovorax* species and subspecies, *Burkholderia* species, and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* by sequence analysis of 16S rDNA, numerical analysis and determinative tests. *Antonie van Leeuwenhoek* 80, 201-214.
- Huang, T. C., and Lee, H. L. (1988). Identification and control of soft-rotting *Erwinia* from phalaenopsis. *Plant prot. Bull.* 30, 416-417 . (Abstract)
- Hyman, L. J., Dewasmes, V., Toth, I. K., and Perombelon, M. C. M. (1997). Improved PCR detection sensitivity of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato tuber peel extract by prior enrichment of a selective medium. *Lett. Appl. Microbiol.* 25, 143-147.
- Kabadjova, P., Dousset, X., Le Cam, V., and Prevost, H. (2002). Differentiation of closely related carnobacterium food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5358-5366.
- Kato, T., Tanaka, T. and Fujita, Y. (1992). Studies on bacterial seedling blight of rice. 1. Classification of bacteria, obtained from diseased seedling of rice in Yamagata prefecture. *Bull Yamagata Agric Exp Stn* 26, 103-109 (in Japanese).
- Kim, B. J., Lee, S. H., Lyu, M. A., Kim, S. J., Bai, G. H., Kim, S. S., Chae, G. T., Kim, E. C., Cha, C.Y., and Kook, Y. H. (1999). Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB). *J. Clin. Microbiol.* 37, 1714-1720.
- Klevan, L., and Wang, J. C. (1980). Deoxyribonucleic acid



- gyrase-deoxyribonucleic acid complex containing 140 base pairs of deoxyribonucleic acid and an  $\alpha 2\beta 2$  protein core. *Biochemistry* 19, 5229-5234.
- Kuhn, D. A., and Starr, M. P. (1960). *Arthrobacter atrocyaneus*, n. sp., and its blue pigment. *Arch. Mikrobiol.* 36, 175-181.
- Kuhn, R., Starr, M. P., Kuhn, D. A., Bauer, H., and Knackmuss, H. J. (1965). Indigoidine and Other Bacterial Pigments Related to 3, 3'-Bipyridyl. *Arch. Microbiol.* 51, 71-84.
- Lee, C. J., Lee, J. T., Kwon, J. H., Kim, B. C., and Park, W. (2005). Occurrence of bacterial soft rot of onion plants caused by *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* in Korea. *Australasian Plant Pathol.* 34, 287-292.
- Lee, Y. A., and Yu, C. P. (2006). A differential medium for the isolation and rapid identification of a plant soft rot pathogen, *Erwinia chrysanthemi*. *Microbiological Methods* 64, 200-206.
- Lee, Y. A., Chen, K. P., and Chang, Y. C. (2002). First report of bacterial soft rot of white flowered calla lily caused by *Erwinia chrysanthemi* in Taiwan. *Plant Dis.* 86, 1273(Abstract).
- Lee, Y. A., Chen, K. P., and Hsu, Y. W. (2006). Characterization of *Erwinia chrysanthemi*, the soft-rot pathogen of white-flowered calla lily, based on pathogenicity and PCR-RFLP and PFGE analyses. *Plant Pathol.* 55, 530-536.
- Leite, R. P., Jr., Jones, J. B., Somodi, G. C., Minsavage, G. V., and Stall, R. E. (1995). Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. *Plant Dis.* 79, 917-922.
- Li T. S. C., and Sholberg, P. L. (1992). Pseudomonaslike early blight on sweet cherries. *Can. Plant Dis. Surv.* 72(2), 121-122.
- Lincoln, S. P., Fermor, T. R., Stead, D. E., and Sellwood, J. E. (1991).

- Bacterial soft rot of *Agaricus bitorquis*. *Plant Pathol.* 40, 136-144.
- Maeda, Y., Shinohara, H., Kiba, A., Ohnishi, K., Furuya, N., Kawamura, Y., Ezaki, T., Vandamme, P., Tsushima, S., Hikichi, Y. (2006). Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* using *gyrB* and *rpoD* sequences. *International Systematic and Evolutionary Microbiol.* 56, 1031-1038.
- Maes, M., Garbeva, P., and Kamoen, O. (1996). Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. *Phytopathol.* 86, 63-69.
- Maher, E. A., de Boer, S. H., and Kelman, A. (1986). Serogroups of *Erwinia carotovora* involved in systemic infection of potato plants and infestation of progeny tubers. *Amer. Potato J.* 63, 1-11.
- Manulis, S., Valinsky, L., Lichter, A., and Gabriel, D. W. (1994). Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* with DNA primers and probes identified by random amplified polymorphic DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4094-4099.
- Meneley, J. C., and Stanghellini, M. E. (1976). Isolation of soft rot *Erwinia* spp. from agricultural soils using an enrichment technique. *Phytopathol.* 66, 367-370.
- Miller, S. A., and Martin, R. R. (1988). Molecular diagnosis of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26, 409-432.
- Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., and Gellert, M. 1978. DNA gyrase: subunit structure and ATPase activity of the purified enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 5960-5963.
- Mollet, C., Drancourt, M., and Raoult, D. (1997). *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol.* 26, 1005-1011.

- Pan, Y. B., Grisham, M. P., and Burner, D. M. (1997). A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis.* 81, 189-194.
- Pan, Y. B., Grisham, M. P., and Burner, D. M. (1998). A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavbacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. *Plant Dis.* 82, 258-290.
- Pan, Y. B., Grisham, M. P., Burner, D. M., Legendre, B. L., and Wei, Q. (1999). Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis.* 83, 218-222.
- Periasamy, M., Niazi, F. R., and Malathi, V. G. (2006). Multiplex RT-PCR, a novel technique for the simultaneous detection of the DNA and RNA viruses causing rice tungro disease. *J. Virol. Methods* 134, 230-236.
- Phillips, J. A., and Kelman, A. (1982). Direct fluorescent antibody stain procedure applied to insect transmission of *Erwinia carotovora*. *Phytopathol.* 72, 898-901.
- Prombelon, M. C. M., and Kelman, A. (1980). Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18, 361-387.
- Reece R. J., and Maxwell A. 1991. DNA gyrase: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26, 335-375.
- Reverchon, S., Rouanet, C., Expert, D., Nasser, W. (2002). Characterization of indigoidine biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity. *Bacteriol.* 184(3), 654-665 .
- Roy, C. P., and Heinemann, J. A. (2006). The general secretory pathway of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricola* BG164R is necessary for cavity disease in white button mushrooms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72,

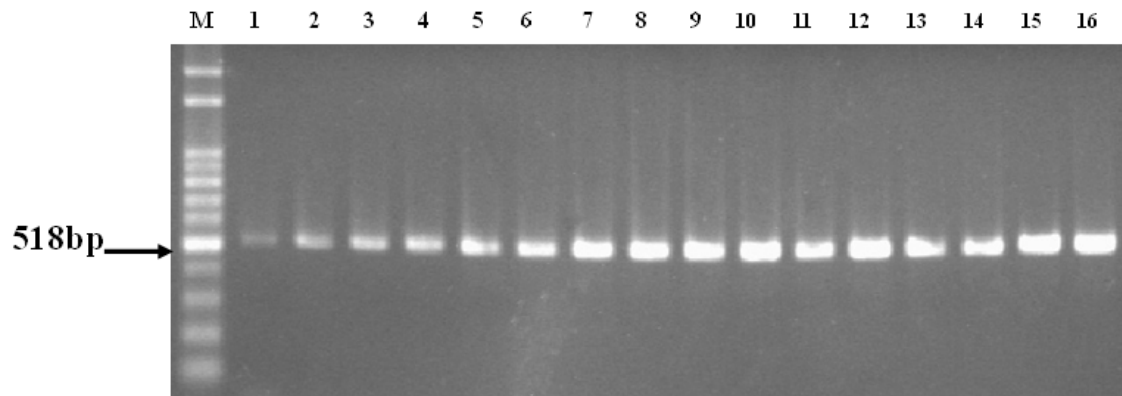
3558-3565.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Salles, J. F., De Souza, F. A., and van Elsas, J. D. (2002). Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1595-1603.
- Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Achouak, W., and Gardan, L. (2004). Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Brenner et al. 1973) Hauben et al. 1998 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species: *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *Inter. Sys. and Evolu. Microbiol.* 55, 1415-1427.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463-5467.
- Schaad N. W., Azad H., Peet R. C., and Panopoulos N. J. 1989. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by a DNA hybridization probe. *Phytopathol.* 79, 903-907.
- Schippers-Lammertse, A. F., Muijsers, A. O., and Klatser-Oedekerck, K. B. (1963). *Arthrobacter polychromogenes* nov. spec., its pigments, and a bacteriophage of this species. *Antonie van Leeuwenhoek* 29, 1-15.
- Severinov, K., Mustaev, A., Kukarin, A., Muzzin, O., Bass, I., Darst, S. A., and Goldfarb, A. (1996). Structural modules of the large subunits of RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 271, 27969-27974.
- Sharman, M., Thomas, J. E., and Dietzgen, R. G. (2000). Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for

- viruses of banana. J. Virol. Methods 89, 75-88.
- Snijder, R. C. (2004). Genetics of *Erwinia* resistance in *Zantedeschia*: impact of plastome-genome incompatibility. Doctorate Thesis. Plant Research International, Wageningen University, Netherlands.p.112.
- Starr, M. P. (1958). The blue pigment of *Corynebacterium insidiosum*. Arch. Mikrobiol. 30, 325-334.
- Starr, M. P., Cosens, G., and Knackmuss, H. J. (1966). Formation of the blue pigment indigoidine by phytopathogenic *Erwinia*. Appl. Microbiol. 14, 870-872.
- Steffan, R. J. and Atlas, R. M. (1991). Polymerase chain reaction: application in environment Microbiol. Annu. Rev. Microbiol. 45, 137-161.
- Sudagidan, M., Yenidunya, A. F., and Gunes, H. (2005). Identification of staphylococci by 16S internal transcribed spacer rRNA gene restriction fragment length polymorphism. Med. Microbiol. 54, 823-826.
- Sung, I. H., Wu, Y. F., Chen, Y. H., Chen, S. C., Lin, M. Y., Chen, S. K., and Cheng, A. S. (2006). The symptom of collapse of *Phalaenopsis* flowers in an environmentally controlled greenhouse. Plant Prot. Bull. 48, 65-70. (Taiwan, R.O.C., in Chinese)
- Toth, I. K., Hyman, L. J., Taylor, R., and Birch, P. R. J. (1998). PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in plant material and its differentiation from *X. c.* pv. *phaseoli*. J. Appl. Microbiol. 85, 327-336.
- Tzeng, K. C., and Hsu, S. T. (1981). Identification and characterization of soft-rotting *Erwinia* in Taiwan. Plant Prot. Bull. 23, 77-85.
- Van Der Wolf, J. M., and Pérebelon, M. C. M. (2002). Section 2: Immunomagnetic separation-colony count on CVP medium (IMS-CVP).p. 17-24. In: Pérebelon, M. C. M., and J. M. Van der

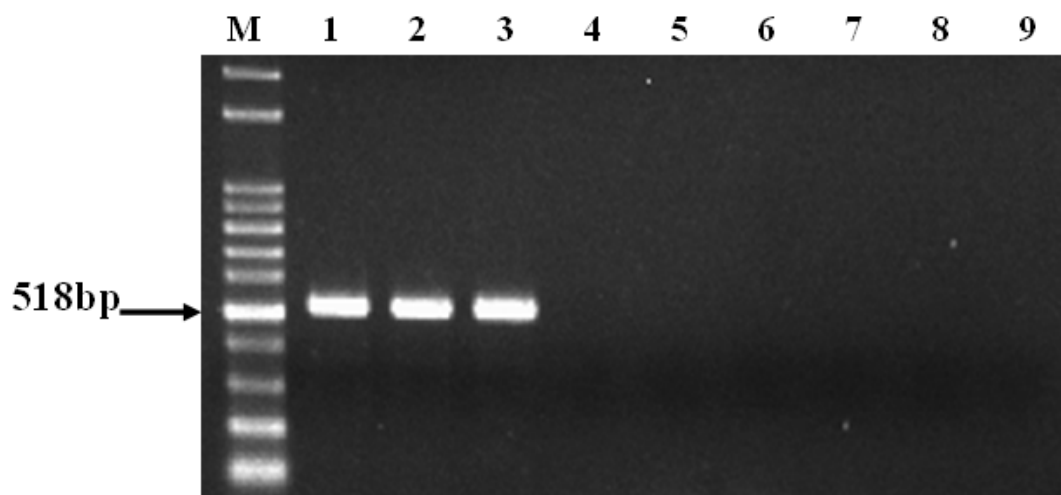
- Wolf(eds.) Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. Scottish Crop Research Institute, Scotland, UK.
- Verdier, V., Mosquera, G., and Assigbetse, K. (1998). Detection of the cassava bacterial blight pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, by polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 82, 79-83.
- Ward, L. J., and de Boer, S. H. (1990). A DNA probe specific for serologically diverse strains of *Erwinia carotovora*. *Phytopathol.* 80, 665-669.
- Ward, L. J., and De Boer, S. H. (1995). PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* associated with potato tissue. *Phytopathol.* 85, 854-858.
- Whitby, P. W., Pope, L. C., Carter, K. B., LiPuma, J. J., Stull, T. L. (2000). Species-specific PCR as a tool for the identification of *Burkholderia gladioli*. *Clin. Microbiol.* 38(1), 282-285.
- Xiong, L., Kong, F., Yang, Y, Cheng, J., and Gilbert, G. L. (2006). Use of PCR and reverse line blot hybridization macroarray based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences for rapid identification of 34 *Mycobacterium* Species. *Clin. Microbiol.* 44, 3544-3550.
- Yang, T. C. (2005). Study of incidences and control of major pests on bird nest fern, *Asplenium* spp. In Hualian area. *Bull. Hualien DAIS.* 23, 31-36. (Taiwan, R.O.C., in Chinese)

陸. 圖表



圖一、以專一性引子組 AAC\_ITS\_F/AAC\_ITS\_R 對不同褐斑病菌菌株染色體 DNA 進行 PCR 複製反應之結果。

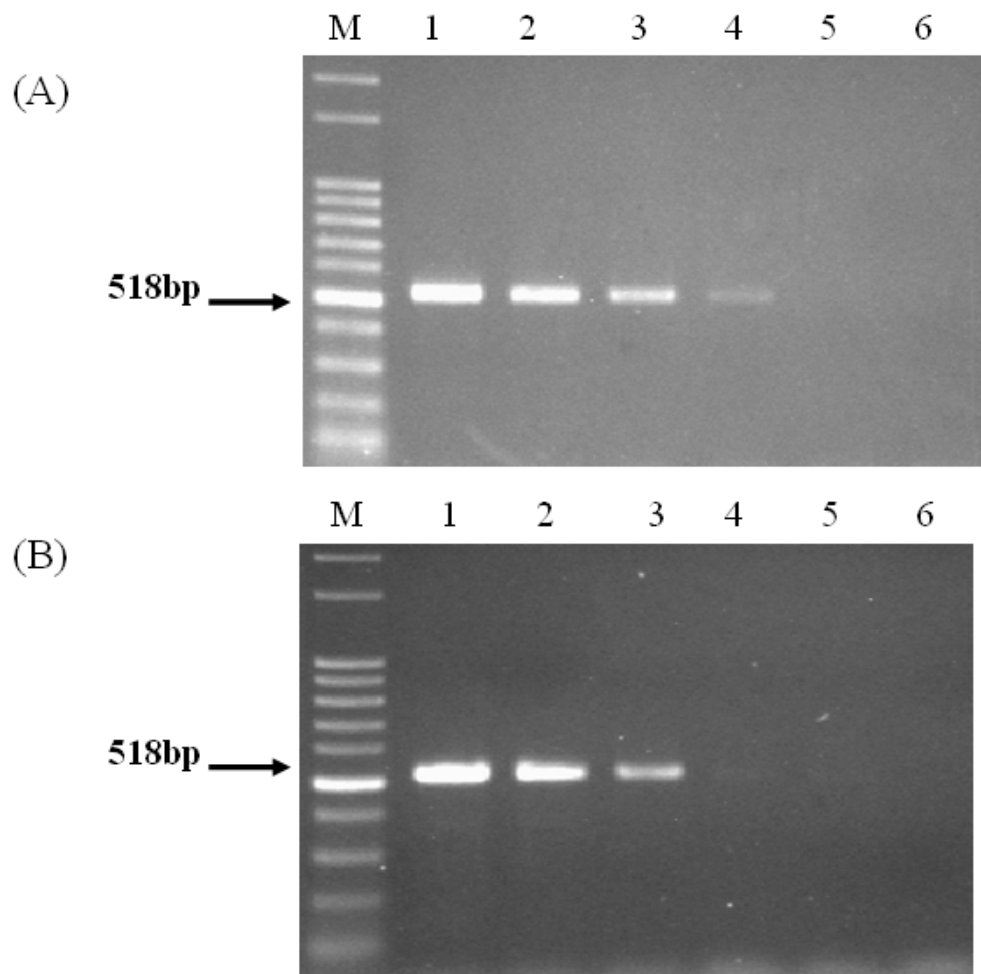
Fig.1. PCR amplification of template DNA from different AAC strains using specific primer pairs AAC \_ITS F/AAC \_ITS R. The following DNAs were used : Lane 1: AAC1, Lane 2: AAC2, Lane 3: AAC4, Lane 4: AAC5, Lane 5: AAC6, Lane 6: AAC7, Lane 7: AAC8, Lane 8: AAC9, Lane 9: AAC12, Lane 10: AAC13, Lane 11: AAC14, Lane 12: AAC15, Lane 13: AAC16, Lane 14: AAC17, Lane 15: AAC18, Lane 16: AAC19, Lane M : 100 bp DNA marker.



圖二、以專一性引子組 AAC ITS\_F/AAC ITS\_R 對褐斑病菌、葉斑病菌及軟腐病菌染色體 DNA 進行 PCR 複製反應之結果。

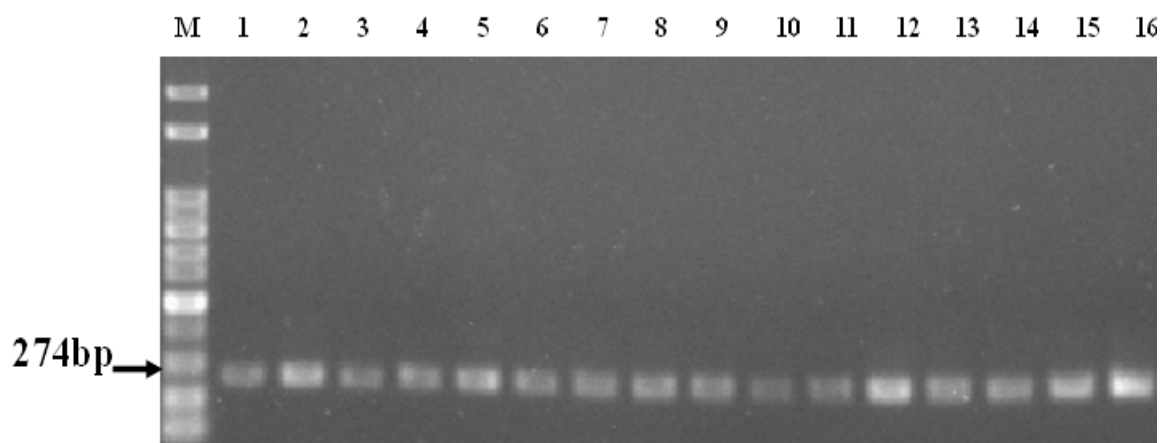
Fig.2. PCR amplification of template DNA from different AAC, BG and PCH strains using specific primer pairs AAC\_ITS F/AAC\_ITS R. The following DNAs were used : Lane 1: AAC12, Lane 2: AAC13, Lane 3: AAC14, Lane 4: OP1, Lane 5: OP43, Lane 6: HD10, Lane 7: ECH3 , Lane 8: ECH12, Lane 9: ECH15, Lane M : 100 bp DNA marker.





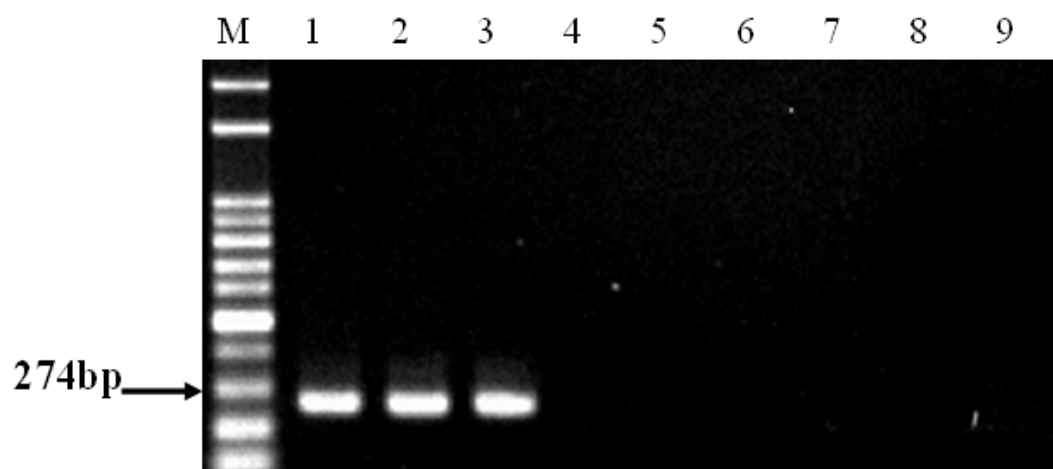
圖三、以專一性引子組 AAC ITS\_F/AAC ITS\_R 對褐斑病菌菌株 AAC12 染色體 DNA 之靈敏度分析。

Fig.3. Sensitivity analysis of PCR using specific primer pairs AAC ITS\_F /AAC ITS\_R for AAC strain AAC12 . (A) Serial dilution of AAC12 genomic DNA, Lanes 1 to 6: the concentration was 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg and 100 fg, respectively. Lane M : 100 bp DNA marker. (B) Serial dilution of AAC12 cells, Lanes 1 to 6: the concentration was  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  and  $10^0$  CFU, respectively . Lane M : 100 bp DNA marker.



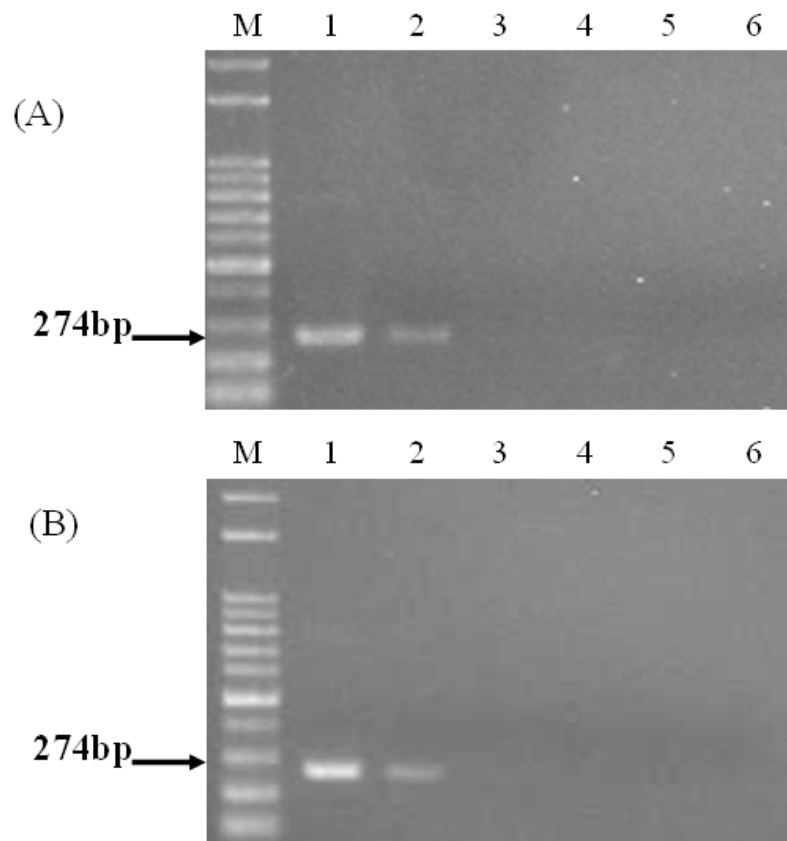
圖四、以專一性引子組 AAC\_rpoB IDF / AAC\_rpoB IDR 對不同褐斑病菌菌株染色體 DNA 進行 PCR 複製反應之結果。

Fig.4. PCR amplification of template DNA from different AAC strains using specific primer pairs AAC\_rpoB IDF /AAC\_rpoB IDR. The following DNAs were used : Lane 1: AAC1, Lane 2: AAC2, Lane 3: AAC4, Lane4: AAC5, Lane 5: AAC6, Lane6: AAC7, Lane7: AAC8, Lane8: AAC9, Lane 9: AAC12, Lane 10:AAC13, Lane 11: AAC14, Lane 12: AAC15, Lane 13: AAC16, Lane 14: AAC17, Lane 15: AAC18, Lane 16: AAC19, Lane M : 100 bp DNA marker.



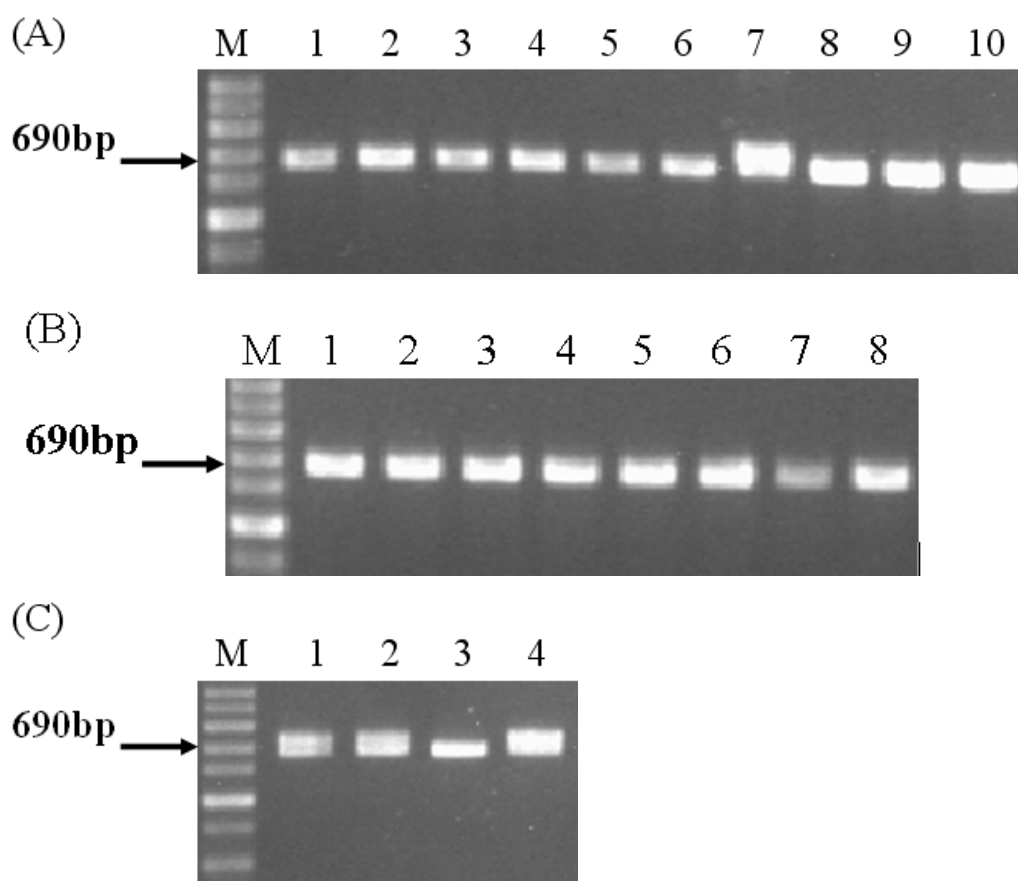
圖五、以專一性引子組 AAC\_rpoB IDF /AAC\_rpoB IDR 對褐斑病菌、葉斑病菌及軟腐病菌染色體 DNA 進行 PCR 複製反應之結果。

Fig.5. PCR amplification of template DNA from different AAC, BG and PCH strains using specific primer pairs AAC\_rpoB IDF /AAC\_rpoB IDR. The following DNAs were used : Lane 1: AAC12, Lane 2: AAC13, Lane 3: AAC14, Lane 4: OP1, Lane 5: OP43, Lane 6: HD10, Lane 7: ECH3, Lane 8: ECH12, Lane 9: ECH15, Lane M : 100 bp DNA marker.



圖六、以專一性引子組 AAC\_rpoB IDF/AAC\_rpoB IDR 對褐斑病菌菌株 AAC12 染色體 DNA 之靈敏度分析。

Fig.6. Sensitivity analysis of PCR using specific primer pairs AAC\_rpoB IDF /AAC\_rpoB IDR for AAC stain AAC12. (A) Serial dilution of AAC12 genomic DNA, Lanes 1 to 6: the concentration was 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg and 100 fg, respectively. Lane M : 100 bp DNA marker. (B) Serial dilution of AAC12 cells, Lanes 1 to 6: the concentration was  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  and  $10^0$  CFU, respectively. Lane M : 100 bp DNA marker.



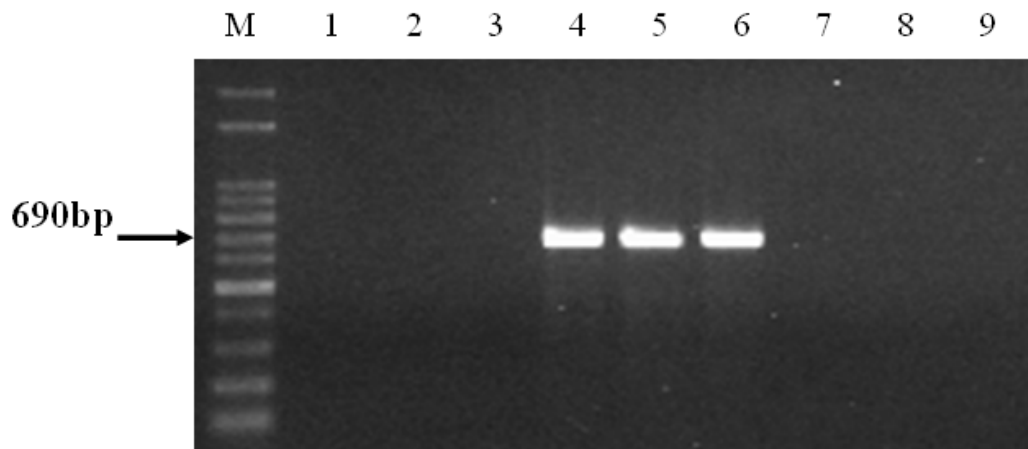
圖七、以專一性引子組 BG\_Uni\_ITS F /BG\_ITS\_IDR 對不同葉斑病菌菌株染色體 DNA 進行 PCR 複製反應之結果。

Fig.7. PCR amplification of template DNA from different BG strains using specific primer pairs BG\_Uni\_ITS F /BG\_ITS\_IDR. The following DNAs were used :

(A)Lane 1: HD1, Lane 2: HD2, Lane 3: HD3, Lane 4: HD9, Lane 5: HD10, Lane 6: HD15, Lane 7: HD16, Lane 8: HD18, Lane 9: HD19, Lane 10: HD21, Lane M : 100 bp DNA marker.

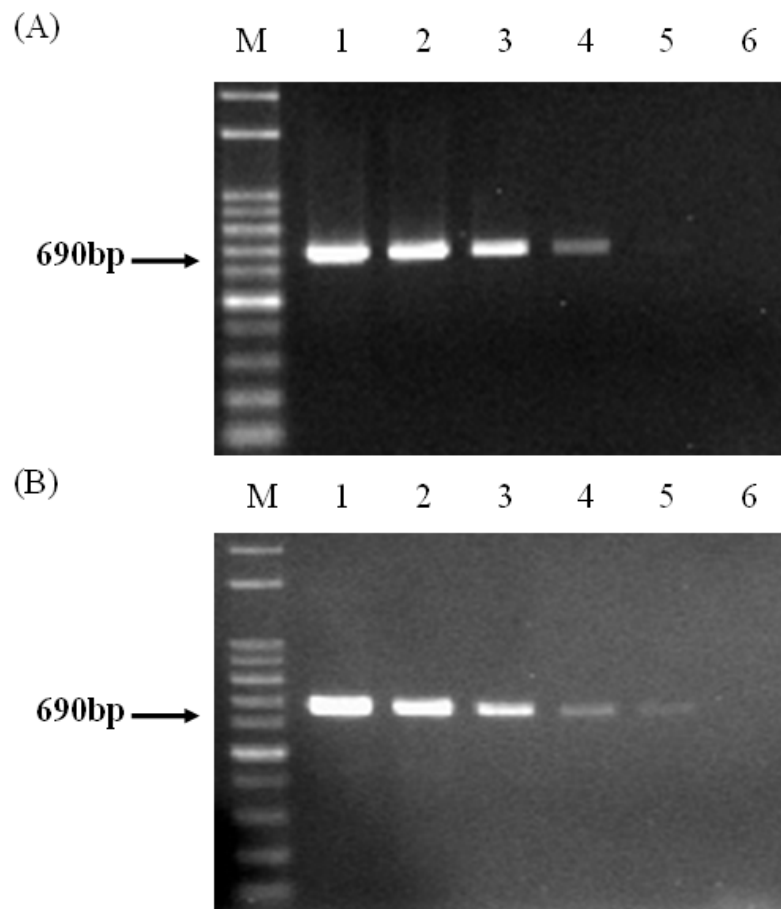
(B)Lane 1: PH1, Lane 2: PH2, Lane 3: PH3, Lane 4: PH5, Lane 5: PH6, Lane 6: PH12, Lane 7: PH13, Lane 8: PH15, Lane M : 100 bp DNA marker.

(C)Lane 1: OP1, Lane 2: OP2, Lane 3: OP5, Lane 4: OP43, Lane M : 100 bp DNA marker.



圖八、以專一性引子組 BG\_Uni\_ITS F /BG\_ITS\_IDR 對褐斑病菌、葉斑病菌及軟腐病菌染色體 DNA 進行 PCR 複製反應之結果。

Fig.8. PCR amplification of template DNA from different AAC, BG and PCH strains using specific primer pairs BG\_Uni\_ITS F /BG\_ITS\_IDR. The following DNAs were used: Lane 1: AAC12, Lane 2: AAC13, Lane 3: AAC14, Lane 4: OP1, Lane 5: OP43, Lane 6: HD10, Lane 7: ECH3, Lane 8: ECH12, Lane 9: ECH15, Lane M: 100 bp DNA marker.

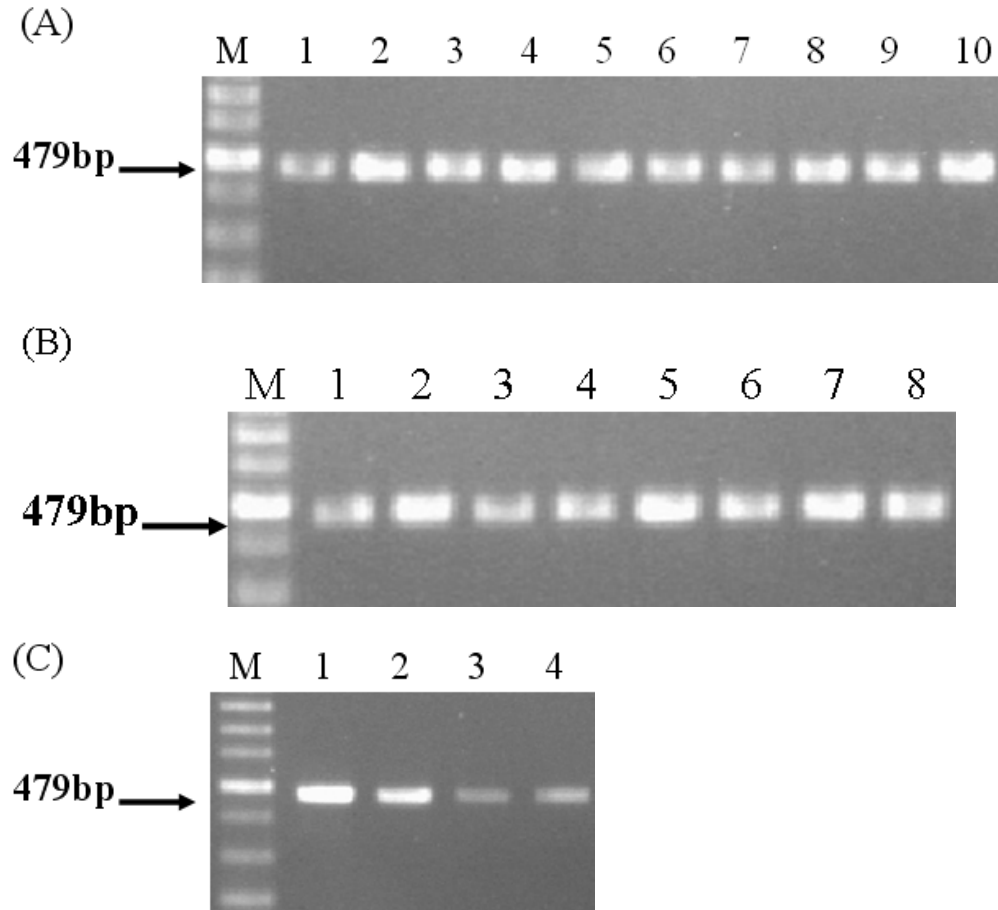


圖九、以專一性引子組 BG\_Uni\_ITS F /BG\_ITS\_IDR 以 PCR 複製葉斑病菌 PH1 染色體 DNA 之靈敏度分析。

Fig.9. Sensitivity analysis of PCR using specific primer pairs BG\_Uni\_ITS F /BG\_ITS\_IDR IDR for BG strain PH1.

(A) Serial dilution of PH1 genomic DNA, Lanes 1 to 6: the concentration was 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg and 100 fg, respectively. Lane M : 100 bp DNA marker.

(B) Serial dilution of PH1 cells, Lanes 1 to 6: the concentration was  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  and  $10^0$  CFU, respectively . Lane M : 100 bp DNA marker



圖十、以專一性引子組 BG\_gyrB\_IDF/ BG\_gyrB\_IDR 對不同葉斑病菌菌株染色體 DNA 進行 PCR 複製反應之結果。

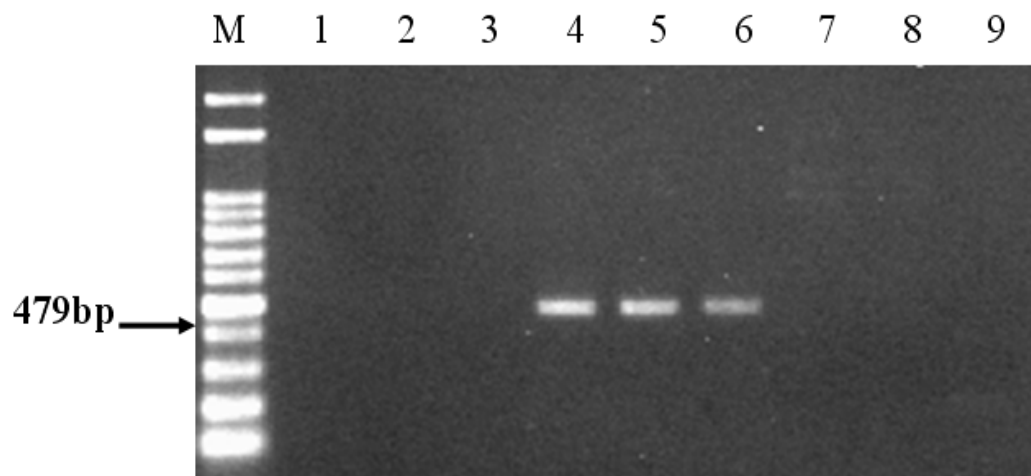
Fig.10. PCR amplification of template DNA from different BG strains using specific primer pairs BG\_gyrB\_IDF/ BG\_gyrB\_IDR. The following DNAs were used :

(A)Lane 1: HD1, Lane 2: HD2, Lane 3: HD3, Lane 4: HD9, Lane 5: HD10, Lane 6: HD15, Lane 7: HD16, Lane 8: HD18, Lane 9: HD19, Lane 10: HD21, Lane M : 100 bp DNA marker.

(B)Lane 1: PH1, Lane 2: PH2, Lane 3: PH3, Lane 4: PH5, Lane 5: PH6, Lane 6: PH12, Lane 7: PH13, Lane 8: PH15, Lane M : 100 bp DNA marker.

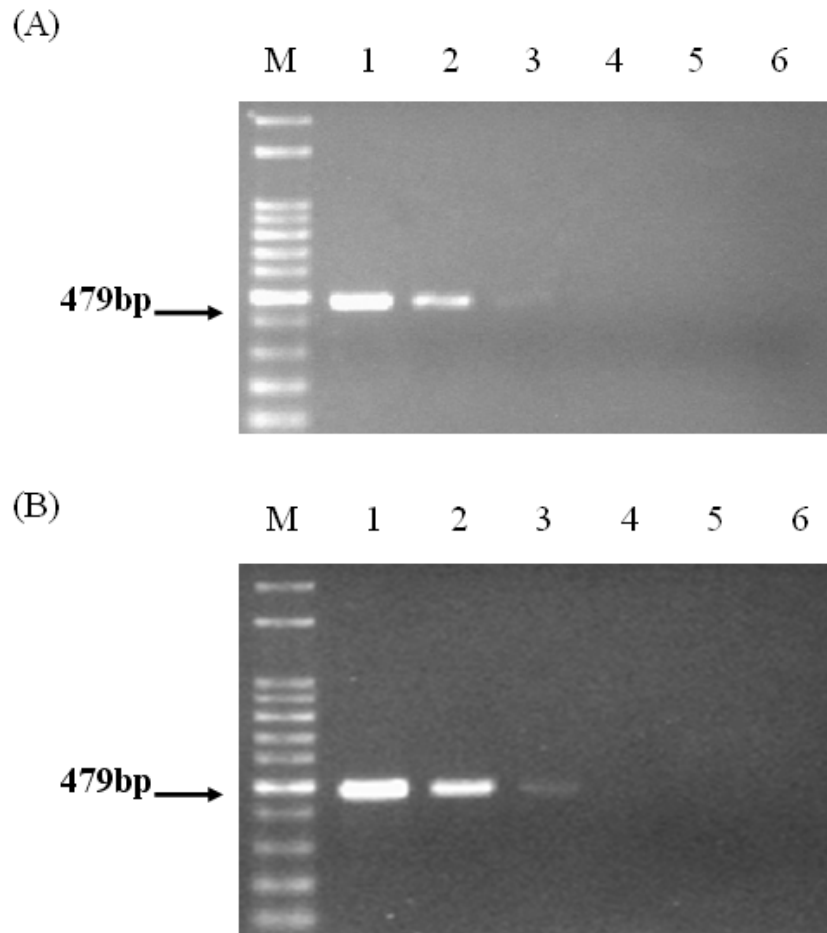
(C)Lane 1: OP1, Lane 2: OP2, Lane 3: OP5, Lane 4: OP43, Lane M : 100 bp DNA marker.





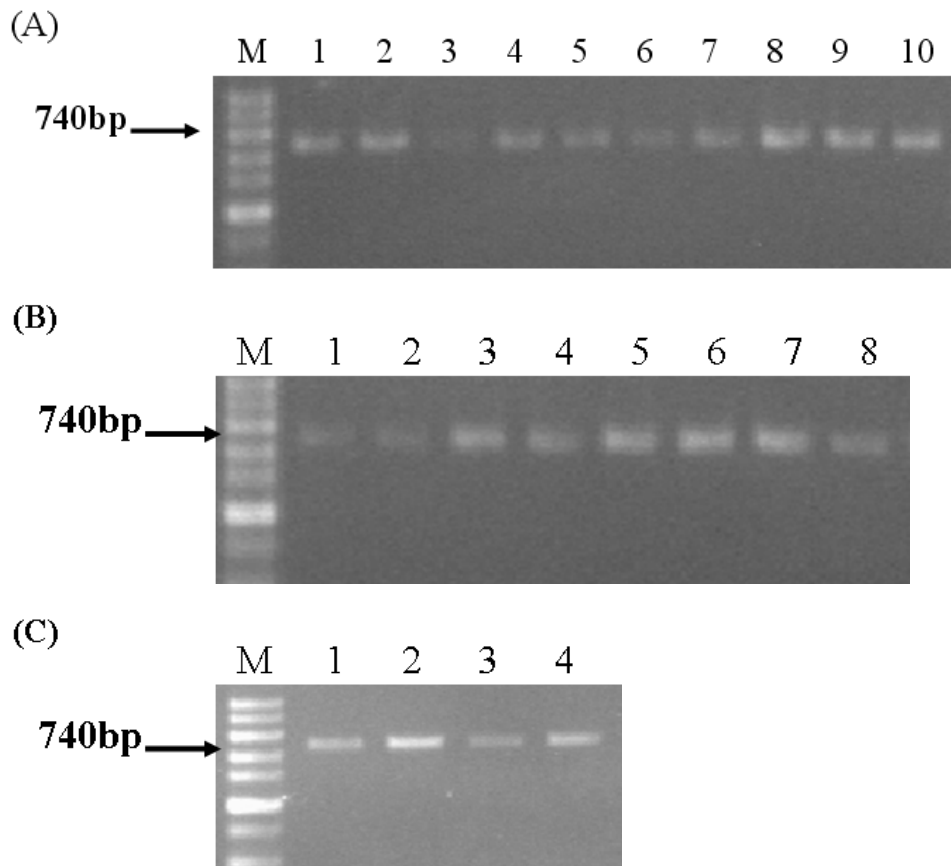
圖十一、以專一性引子組 BG\_gyrB\_IDF/ BG\_gyrB\_IDR 對褐斑病菌、葉斑病菌及軟腐病菌染色體 DNA 進行 PCR 複製反應之結果。

Fig.11. PCR amplification of template DNA from different AAC, BG and PCH strains using specific primer pairs BG\_gyrB\_IDF/ BG\_gyrB\_IDR. The following DNAs were used: Lane 1: AAC12, Lane 2: AAC13, Lane 3: AAC14, Lane 4: OP1, Lane 5: OP43, Lane 6: HD10, Lane 7: ECH3, Lane 8: ECH12, Lane 9: ECH15, Lane M: 100 bp DNA marker.



圖十二、以專一性引子組 BG\_gyrB\_IDF/ BG\_gyrB\_IDR 以 PCR 複製葉斑病菌 PH1 染色體 DNA 之靈敏度分析。

Fig.12. Sensitivity analysis of PCR using specific primer pairs BG\_gyrB\_IDF/ BG\_gyrB\_IDR for BG strain PH1. (A) Serial dilution of PH1 genomic DNA, Lanes 1 to 6: the concentration was 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg and 100 fg, respectively. Lane M : 100 bp DNA marker. (B) Serial dilution of PH1 cells, Lanes 1 to 6: the concentration was  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  and  $10^0$  CFU, respectively. Lane M : 100 bp DNA marker.



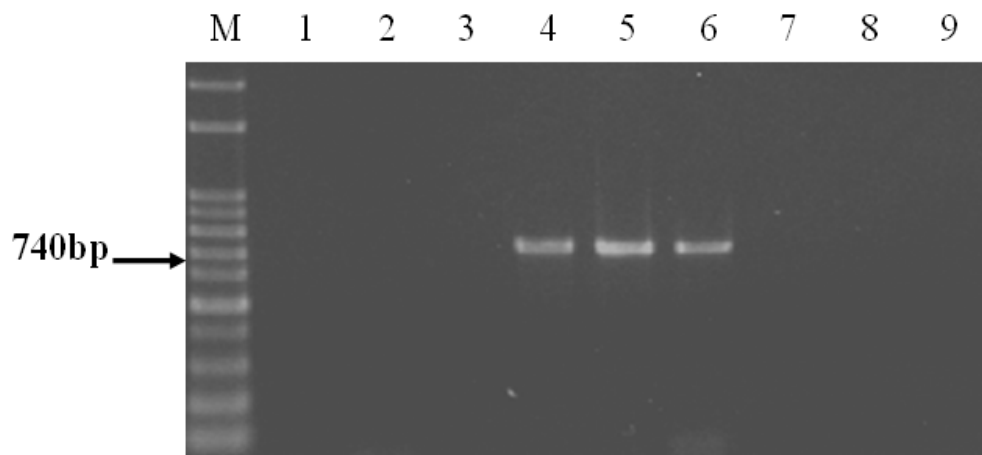
圖十三、以專一性引子組 BG\_rpoD\_IDF /BG\_rpoD\_IDR 對不同葉斑病菌菌株染色體 DNA 進行 PCR 複製反應之結果。

Fig.13. PCR amplification of template DNA from different BG strains using specific primer pairs BG\_rpoD\_IDF /BG\_rpoD\_IDR. The following DNAs were used :

(A)Lane 1: HD1, Lane 2: HD2, Lane 3: HD3, Lane 4: HD9, Lane 5: HD10, Lane 6: HD15, Lane 7: HD16, Lane 8: HD18, Lane 9: HD19, Lane 10: HD21, Lane M : 100 bp DNA marker.

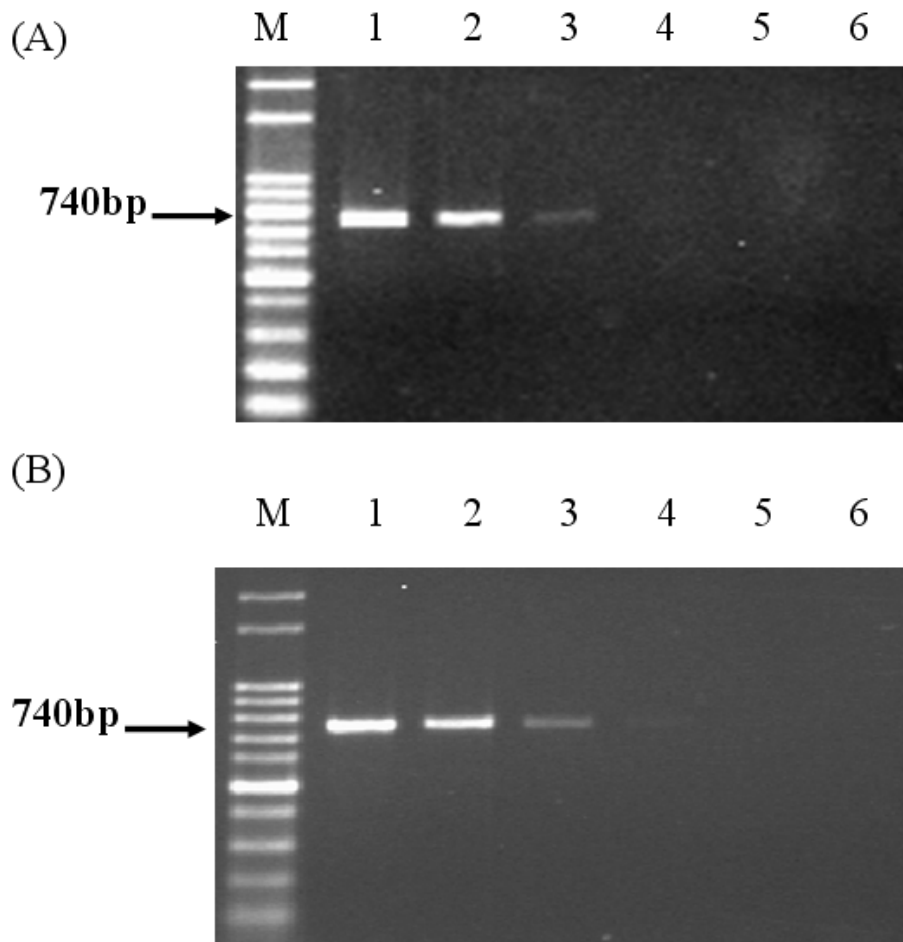
(B)Lane 1: PH1, Lane 2: PH2, Lane 3: PH3, Lane 4: PH5, Lane 5: PH6, Lane 6: PH12, Lane 7: PH13, Lane 8: PH15, Lane M : 100 bp DNA marker.

(C)Lane 1: OP1, Lane 2: OP2, Lane3: OP5, Lane4: OP43, Lane M : 100 bp DNA marker.



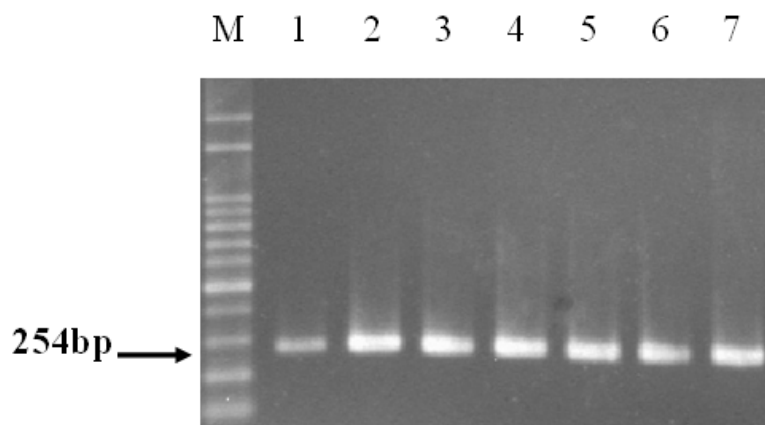
圖十四、以專一性引子組 BG\_rpoD\_IDF /BG\_rpoD\_IDR 對褐斑病菌、葉斑病菌及軟腐病菌染色體 DNA 進行 PCR 複製反應之結果。

Fig.14. PCR amplification of template DNA from different AAC, BG and PCH strains using specific primer pairs BG\_rpoD\_IDF /BG\_rpoD\_IDR. The following DNAs were used : Lane 1: AAC12, Lane 2: AAC13, Lane 3: AAC14, Lane 4: OP1, Lane 5: OP43, Lane 6: HD10, Lane 7: ECH3 , Lane 8: ECH12, Lane 9: ECH15, Lane M : 100 bp DNA marker.



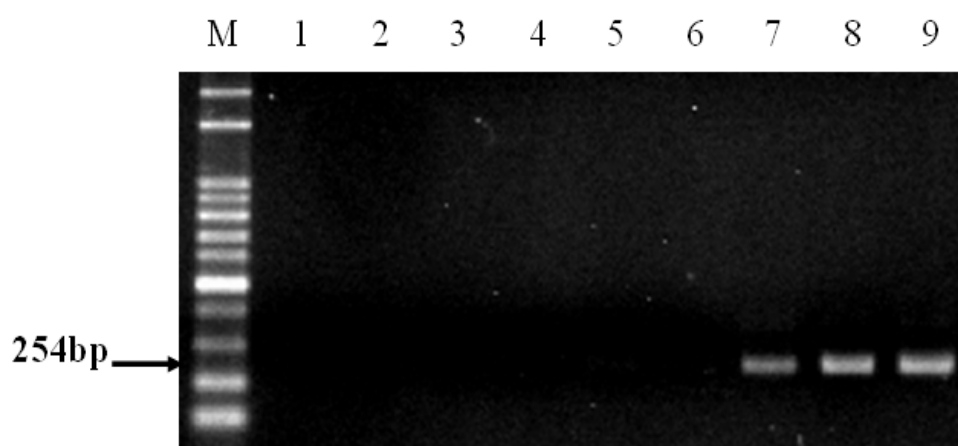
圖十五、以專一性引子組 BG\_rpoD\_IDF /BG\_rpoD\_IDR 以 PCR 複製葉斑病菌菌株 PH1 染色體 DNA 之靈敏度分析。

Fig.15. Sensitivity analysis of PCR using specific primer pairs BG\_rpoD\_IDF /BG\_rpoD\_IDR for BG strain PH1. (A) Serial dilution of PH1 genomic DNA, Lanes 1 to 6: the concentration was 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg and 100 fg, respectively. Lane M : 100 bp DNA marker. (B) Serial dilution of PH1 cells, Lanes 1 to 6: the concentration was  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  and  $10^0$  CFU, respectively. Lane M : 100 bp DNA marker.



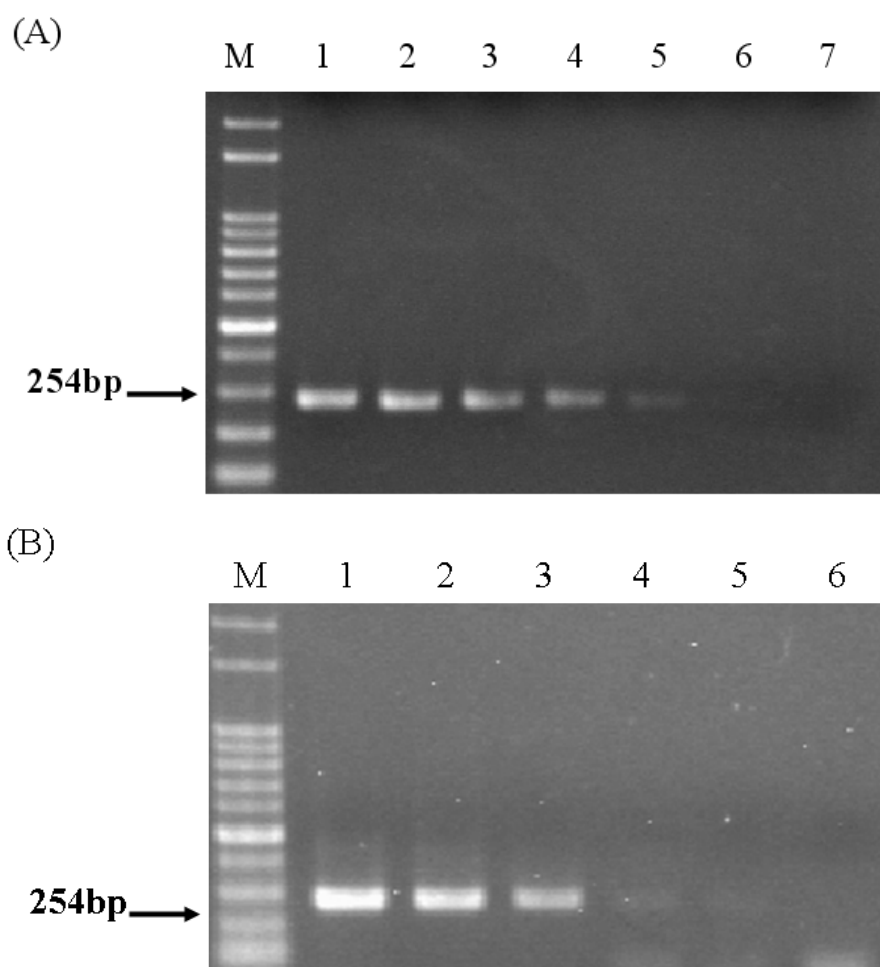
圖十六、以專一性引子組 PEC\_Uni\_ITS F /PEC\_ ITS R 對不同軟腐病菌菌株染色體 DNA 進行 PCR 複製反應之結果。

Fig.16. PCR amplification of template DNA from different PCH strains using specific primer pairs PEC\_Uni\_ITS F /PEC\_ ITS R. The following DNAs were used : Lane 1: ECH1, Lane 2: ECH3, Lane 3: ECH12, Lane 4: ECH15, Lane 5: ECH51, Lane 6: ECH52, Lane 7: ECH53, Lane M : 100 bp DNA marker.



圖十七、以專一性引子組 PEC\_Uni\_ITS F /PEC\_ ITS R 對褐斑病菌、  
葉斑病菌及軟腐病菌染色體 DNA 進行 PCR 複製反應之結果。

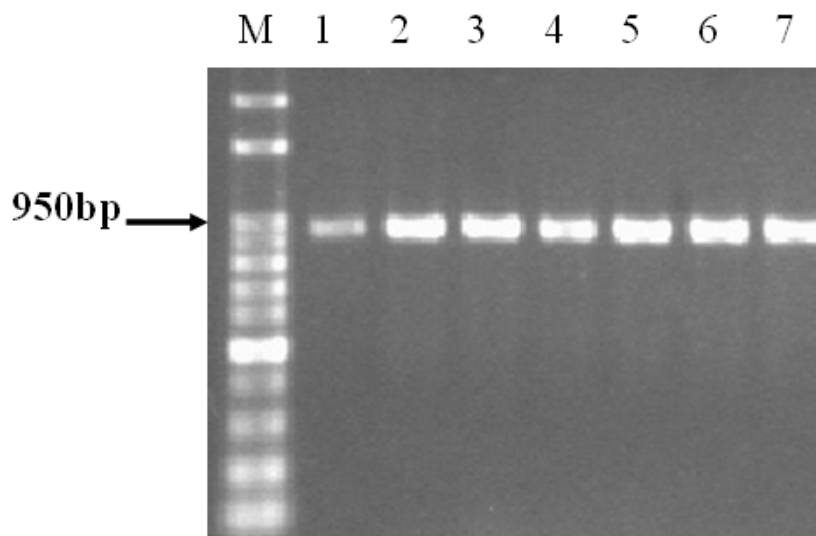
Fig.17. PCR amplification of template DNA from different AAC, BG and PCH strains using specific primer pairs PEC\_Uni\_ITS F /PEC\_ ITS R. The following DNAs were used : Lane 1: AAC12, Lane 2: AAC13, Lane 3:AAC14, Lane 4: OP1, Lane 5: OP43, Lane 6: HD10, Lane 7: ECH3 , Lane 8: ECH12, Lane 9: ECH15, Lane M : 100 bp DNA marker.



圖十八、以專一性引子組 PEC\_Uni\_ITS F /PEC\_ITS R 對軟腐病菌菌株 ECH12 染色體 DNA 之靈敏度分析。

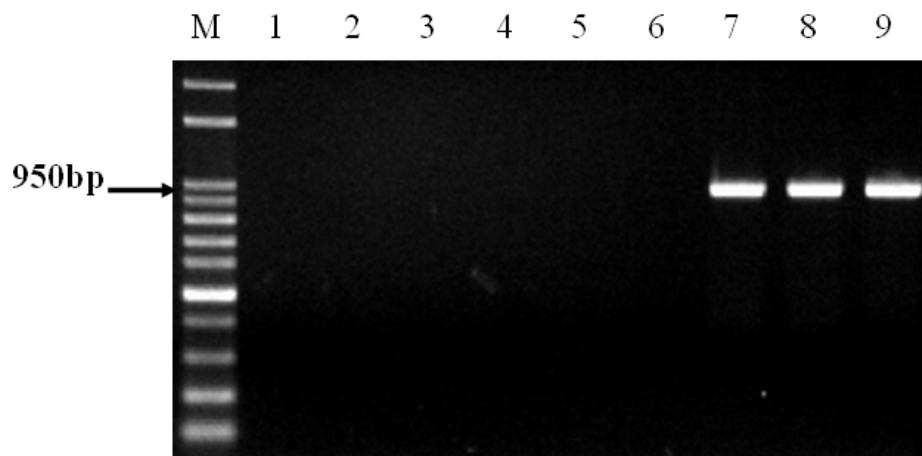
Fig.18. Sensitivity analysis of PCR using specific primer pairs PEC\_Uni\_ITS F /PEC\_ITS R for PCH strain ECH12. (A) Serial dilution of ECH12 genomic DNA, Lanes 1 to 7: the concentration was 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg and 10 fg, respectively. Lane M: 100 bp DNA marker. (B) Serial dilution of ECH12 cells, Lanes 1 to 6: the concentration was  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  and  $10^0$  CFU, respectively. Lane M: 100 bp DNA marker.





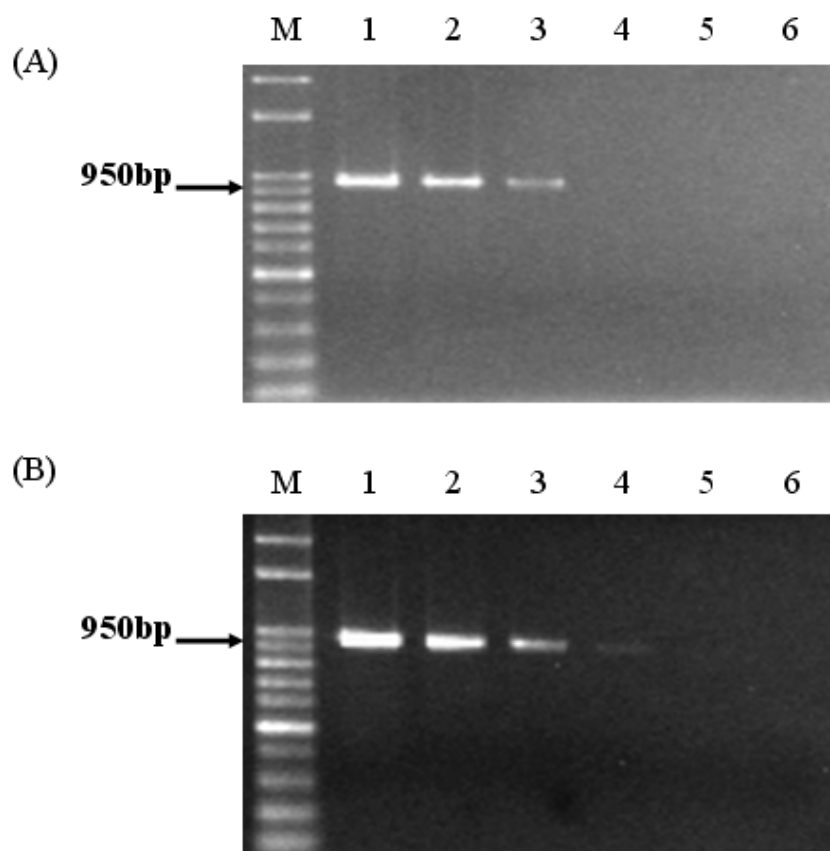
圖十九、以專一性引子組 idgA start 5'F/idgA stop 3'R 對不同軟腐病菌  
菌株染色體 DNA 進行 PCR 複製反應之結果。

Fig.19. PCR amplification of template DNA from different PCH strains using specific primer pairs idgA start 5'F/idgA stop 3'R. The following DNAs were used : Lane 1: ECH1, Lane 2: ECH3, Lane 3: ECH12, Lane 4: ECH15, Lane 5: ECH51, Lane 6: ECH52, Lane 7: ECH53, Lane M : 100 bp DNA marker.



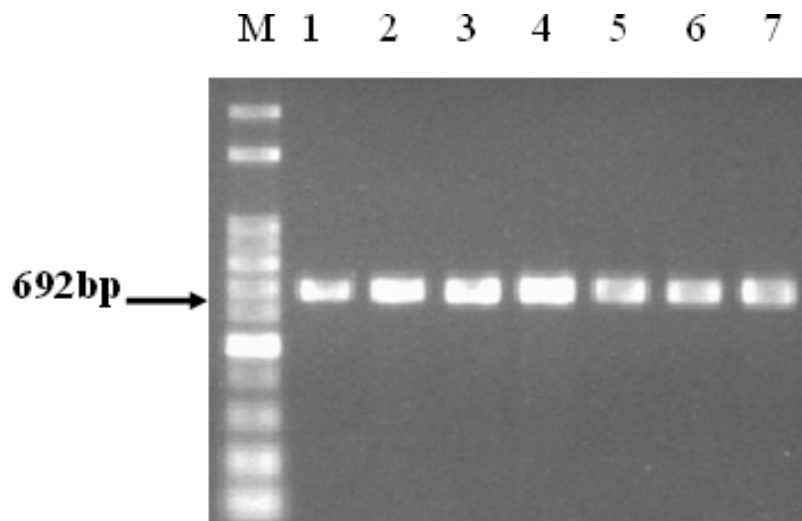
圖二十、以專一性引子組 idgA start 5'F/idgA stop 3'R 對褐斑病菌、葉斑病菌及軟腐病菌染色體 DNA 進行 PCR 複製反應之結果。

Fig.20. PCR amplification of template DNA from different AAC, BG and PCH strains using specific primer pairs idgA start 5'F/idgA stop 3'R. The following DNAs were used : Lane 1: AAC12, Lane 2: AAC13, Lane 3:AAC14, Lane 4: OP1, Lane 5: OP43, Lane 6: HD10, Lane 7: ECH3 , Lane 8: ECH12, Lane 9: ECH15, Lane M : 100 bp DNA marker.



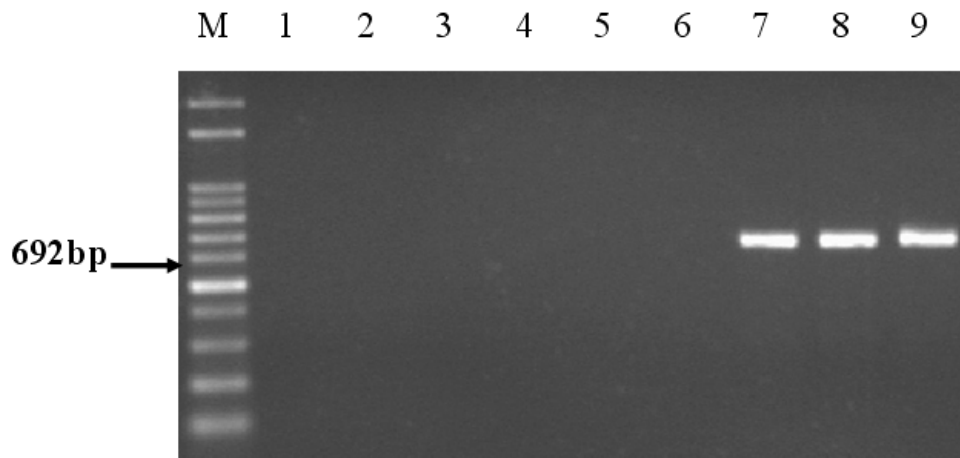
圖二十一、以專一性引子組 *idgA* start 5'F/*idgA* stop 3'R 以 PCR 複製軟腐病菌菌株 ECH12 染色體 DNA 之靈敏度分析。

Fig.21. Sensitivity analysis of RCR using specific primer pairs *idgA* start 5'F /*idgA* stop 3'R for PCH strain ECH12. (A) Serial dilution of ECH12 genomic DNA, Lanes 1 to 6: the concentration was 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg and 100 fg, respectively. Lane M : 100 bp DNA marker. (B) Serial dilution of ECH12 cells, Lanes 1 to 6: the concentration was  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  and  $10^0$  CFU, respectively . Lane M : 100 bp DNA marker.



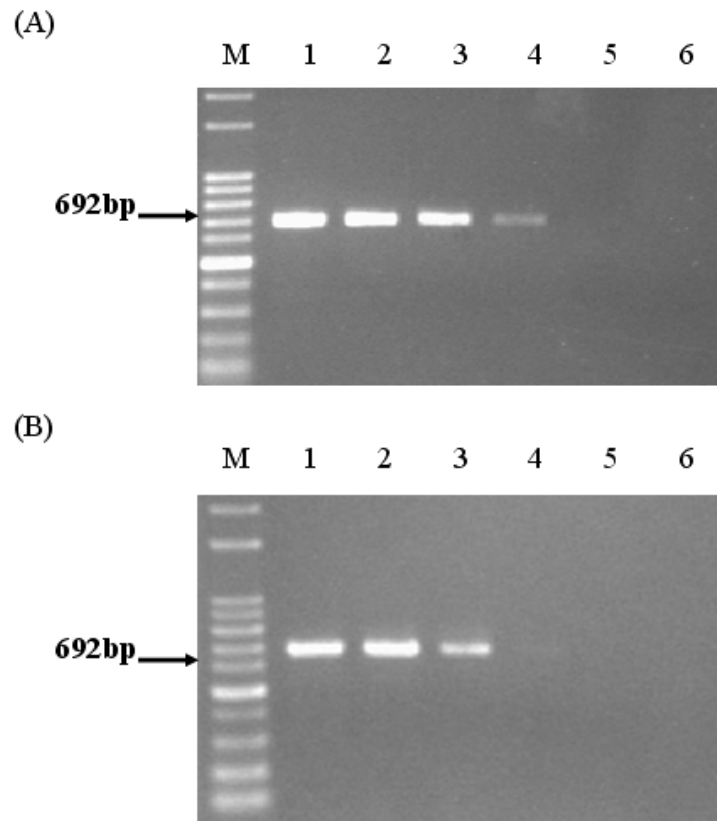
圖二十二、以專一性引子組 idgB start 5'F/idgB stop 3'R 對不同軟腐病菌菌株染色體 DNA 進行 PCR 複製反應之結果。

Fig.22. PCR amplification of template DNA from different PCH strains using specific primer pairs idgB start 5'F/idgB stop 3'R. The following DNAs were used : Lane 1: ECH1, Lane 2: ECH3, Lane 3: ECH12, Lane 4: ECH15, Lane 5: ECH51, Lane 6: ECH52, Lane 7: ECH53, Lane M : 100 bp DNA marker.



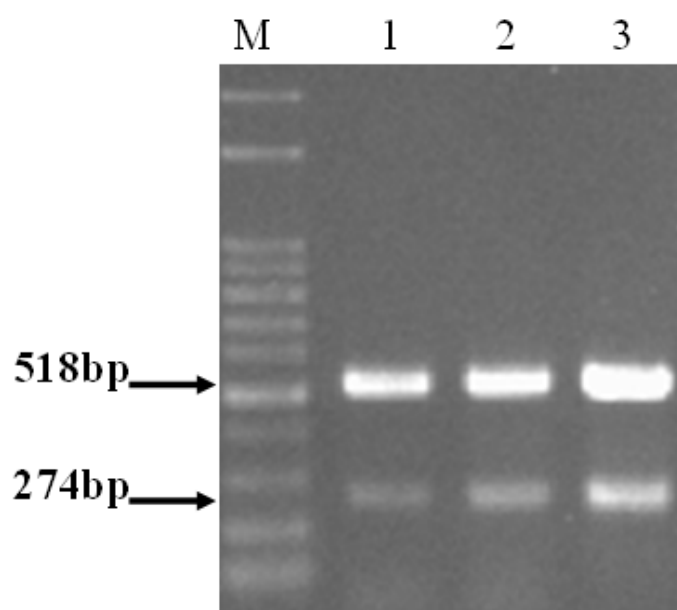
圖二十三、以專一性引子組 idgB start 5'F/idgB stop 3'R 對褐斑病菌、  
葉斑病菌及軟腐病菌染色體 DNA 進行 PCR 複製反應之結果。

Fig.23. PCR amplification of template DNA from different AAC, BG and PCH strains using specific primer pairs idgB start 5'F/idgB stop 3'R. The following DNAs were used : Lane 1: AAC12, Lane 2: AAC13, Lane 3: AAC14, Lane 4: OP1, Lane 5: OP43, Lane 6: HD10, Lane 7: ECH3 , Lane 8: ECH12, Lane 9: ECH15, Lane M : 100 bp DNA marker.



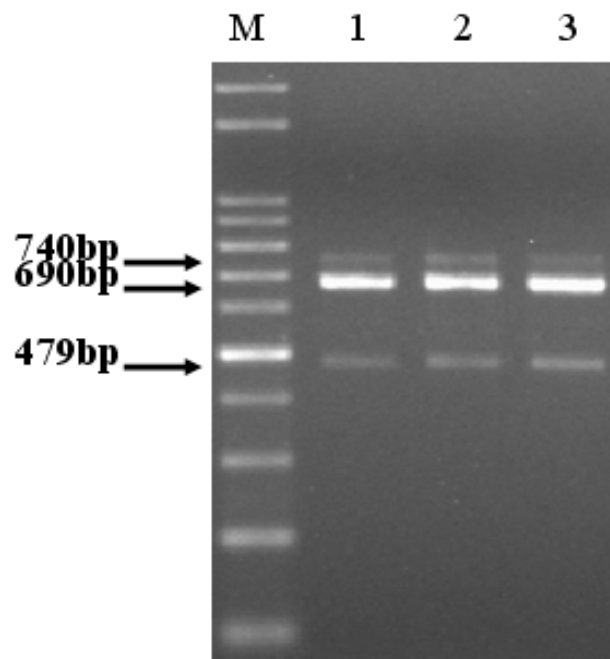
圖二十四、以專一性引子組 idgB start 5'F/idgB stop 3'R 以 PCR 複製軟腐病菌菌株 ECH12 染色體 DNA 之靈敏度分析。

Fig.24. Sensitivity analysis of PCR using specific primer pairs idgB start 5'F /idgB stop 3'R for PCH stain ECH12. (A) Serial dilution of ECH12 genomic DNA, Lanes 1 to 6: the concentration was 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg and 100 fg, respectively. Lane M : 100 bp DNA marker. (B) Serial dilution of ECH12 cells, Lanes 1 to 6: the concentration was  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  and  $10^0$  CFU, respectively. Lane M : 100 bp DNA marker.



圖二十五、以專一性引子組 AAC ITS\_F/AAC ITS\_R 及 AAC\_rpoB\_IDF /AAC\_rpoB\_IDR 進行 Multiplex PCR 偵測 AAC 菌株之染色體 DNA 檢測結果。

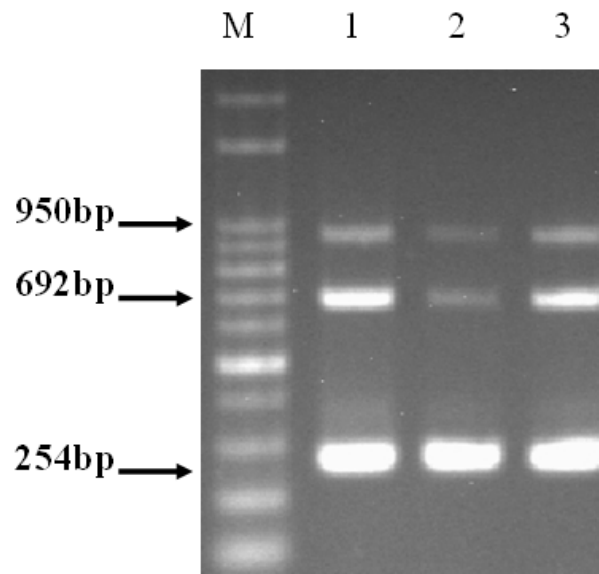
Fig.25. Multiplex PCR amplification of template DNA from different AAC strains using 2 sets of primer pairs (AAC\_rpoB\_IDF/ AAC\_rpoB\_IDR and AAC ITS\_F/AAC ITS\_R) at the same PCR reaction. Lane 1: AAC16, Lane 2: AAC17, Lane 3: AAC 18, Lane M : 100 bp DNA marker.



圖二十六、以專一性引子組 BG\_Uni\_ITS F/BG\_ITS\_IDR、  
BG\_gyrB\_IDF /BG\_gyrB\_IDR 及 BG\_rpoD\_IDF  
/BG\_rpoD\_IDR 進行 Multiplex PCR 偵測 BG 染色體 DNA  
之檢測結果。

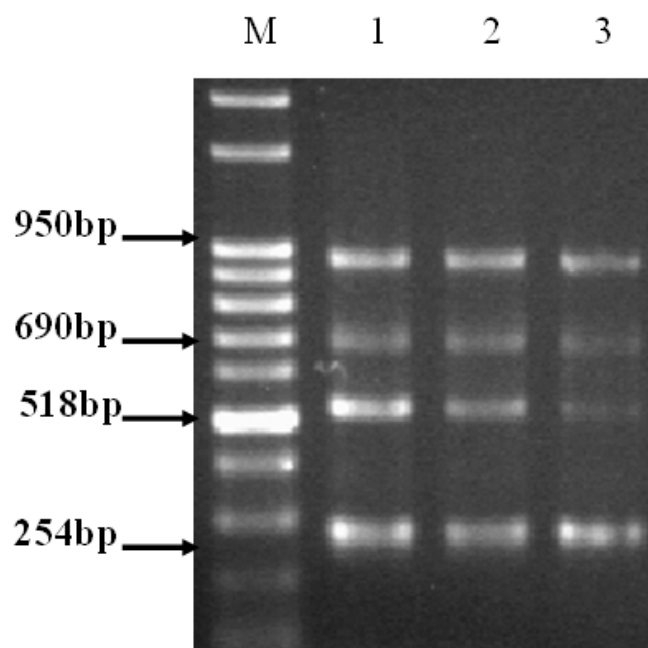
Fig.26. Multiplex PCR amplification of template DNA from different BG strains using 3 sets of primer pairs (BG\_Uni\_ITS F/BG\_ITS\_IDR、BG\_gyrB\_IDF/ BG\_gyrB\_IDR and BG\_rpoD\_IDF /BG\_rpoD\_IDR) at the same PCR reaction. Lane 1: OP5, Lane 2: HD15, Lane 3: PH5, Lane M : 100 bp DNA marker.





圖二十七、以專一性引子組 PEC\_Uni\_ITS F/PEC\_ ITS R、idgA start 5'F/idgA stop 3'R 及 idgB start 5'F/idgB stop 3'R 進行 Multiplex PCR 偵測 ECH 染色體 DNA 之檢測結果。

Fig.27. Multiplex PCR amplification template DNA from different PCH strains using 3 sets of primer pairs (PEC\_Uni\_ITS F/PEC\_ ITS R、idgA start 5'F/idgA stop 3'R and idgB start 5'F/idgB stop 3'R) at the same reaction. Lane 1: ECH1, Lane 2: ECH12, Lane 3: ECH15, Lane M : 100 bp DNA marker



圖二十八、以專一性引子組 AAC ITS\_F/AAC ITS\_R、BG\_Uni ITS F/BG ITS\_IDR、PEC\_Uni ITS F/PEC ITS R 及 idgA start 5'F/idgA stop 3'R 進行 Multiplex PCR 偵測 AAC、BG 及 ECH 染色體 DNA 之檢測結果。

Fig.28. Multiplex PCR amplification template DNA from AAC, BG and PCH strains using 4 sets of primer pairs (AAC ITS\_F/AAC ITS\_R、BG\_Uni ITS F/BG ITS\_IDR、PEC\_Uni ITS F/PEC ITS R and idgA start 5'F/idgA stop 3'R) at the same reaction. Lane 1: AAC9、OP5、Ech3, Lane 2: AAC12、HD15、ECH12, Lane 3: AAC13、PH5、ECH15, Lane M : 100 bp DNA marker.

表一、本研究所使用之褐斑病菌、葉斑病菌及軟腐病菌菌株表

Table 1. Bacterial strains of AAC、BG and PCH used in this study.

<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>		
Source	Host	Strain
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	AAC1
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	AAC2
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	AAC4
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	AAC5
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	AAC6
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	AAC7
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	AAC8
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	AAC9
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	AAC12
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	AAC13
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	AAC14
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	AAC15
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	AAC16
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	AAC17
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	AAC18
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	AAC19
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>		
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	ECH1
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	ECH3
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	ECH12
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	ECH15
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	ECH51

續、本研究所使用之褐斑病菌、葉斑病菌及軟腐病菌菌株表

Bacterial strains of AAC、BG and PCH used in this study.

<i>Burkholderia gladioli</i>		
Source	Host	Strain
台南區農業改良場	文心蘭-蝴蝶蘭	OP1
台南區農業改良場	文心蘭-蝴蝶蘭	OP2
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	OP5
台南區農業改良場	文心蘭-蝴蝶蘭	OP43
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	PH1
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	PH2
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	PH3
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	PH5
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	PH6
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	PH12
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	PH13
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	PH15
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	HD1
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	HD2
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	HD3
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	HD9
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	HD10
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	HD15
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	HD16
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	HD18
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	HD19
台南區農業改良場	蝴蝶蘭	HD21

表二、聚合酵素鏈鎖反應所分別使用之引子名稱與序列

Table 2. Oligonucleotide primers used in PCR amplication.

Pathogenic bacteria	Primer	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature °C	Reference(s)
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	AA_Uni_ITS F	AGAAGTAGGTAGCCTAACCGTA	52	This study
	AA_Uni_ITS R	GCGTTATGCCGTAATGTGAA	52	This study
	AAC_ITS_F	GCCCACACTTATCGGTTGTT	55	(Gou, 2007)
	AAC_ITS_R	GCGTTATGCCGTAATGTGAA	55	(Gou, 2007)
	AAC_rpoB_Uni F	GGAAATCACGCACAAGCGC	52	This study
	AAC_rpoB_Uni R	GCTTCGTCGTCGTTTACGCG	52	This study
	AAC_rpoB_IDF	ACGCTGGATGCCGAAGGCC	52	This study
	AAC_rpoB_IDR	CGGAGTCCACGGCAGCCAC	52	This study
<i>Burkholderia gladioli</i>	BG_Uni_ITS F	GTGAATACGTTCCCGGGTCTT	52	This study
	BG_Uni_ITS R	ATCTGCGGATCAAAGCTCGT	52	This study
	BG_Uni_ITS F	GTGAATACGTTCCCGGGTCTT	55	This study
	BG_ITS_IDR	TACAGGTTGAGTTCTCGCAT	55	This study
	BG_gyrB_IDF	CTGCGCCTGGTGGTGAAG	55	(Maeda et al., 2006)
	BG_gyrB_IDR	CCGTCCCGCTGCGGAATA	55	(Maeda et al., 2006)
	BG_rpoD_IDF	GGCCTGCGCCACATGGTGAT	50	This study
	BG_rpoD_IDR	TGGCGCGCCTTCAGTTCGC	50	This study

續、聚合酵素鏈鎖反應所分別使用之引子名稱與序列

Oligonucleotide primers used in PCR amplication.

Pathogenic bacteria	Primer	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature °C	Reference(s)
	PEC_Uni_ITS F	TCGCTAGTAATCGTAGATCAG	52	This study
	PEC_Uni_ITS R	ACACCACGCAGGCACTTCAAC	52	This study
	PEC_Uni_ITS F	TCGCTAGTAATCGTAGATCAG	59	This study
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	PEC_ITS_R	AGCTTCGCAAGACGCTTTTGACTC	59	This study
	idgA_start 5'F	ATGTCTAAAACGGATTTTTC	52	(朱，1995)
	idgA_stop 3'R	TTATGCCTGGTTTTGCTGCC	52	(朱，1995)
	idgB_start 5'F	ATGAAGCCACTTGTGATTTT	52	(朱，1995)
	idgB_stop 3'R	TCAACAATAAGATATCGGGG	52	(朱，1995)